

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ**

\*\*\*\*\*

**ТИХОМИР ПЪРВАНОВ ТОДОРОВ**

**МОЛЕКУЛНИ ОСНОВИ НА СИНДРОМИ С УМСТВЕНО**  
**ИЗОСТАВАНЕ В БЪЛГАРИЯ**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертационен труд**  
**за присъждане на образователна и научна степен**  
**„ДОКТОР”**

**Научна специалност: „Биохимия”**

**Шифър: 01.06.10**

**НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:**

**Проф. Д-р Ваньо Митев, ДМ, ДБН**

**ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ:**

**Доц. Алексей Савов, дб**

**Член-кор. Проф. Иван Иванов, дб**

**София, 2011**

Дисертационният труд съдържа 161 страници,  
54 фигури и 23 таблици.

Цитирани са 164 литературни източника и 19 интернет сайта.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита  
от Катедра по Медицинска Химия и Биохимия,  
Медицински Университет – София.

Включените в дисертацията изследвания са извършени в:  
Катедра по Медицинска Химия и Биохимия,  
Медицински Университет – София;

Генетична Медико-Диагностична Лаборатория „Геника”, София

Работата по дисертационния труд е финансирана частично  
от Съвета за медицинска наука  
на Медицински Университет – София  
(Договори 8-Д/2008 и 27/2009).

Дисертационният труд е представен на заседание на разширен  
катедрен съвет на Катедра „Медицинска Химия и Биохимия”,  
Медицински Университет - София, на 11.05.2011.

Защитата ще се състои на 06.12.2011 от 11:00 часа в заседателната  
зала на Катедра „Медицинска Химия и Биохимия“, ул. „Здраве“ 2,  
София 1431

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се  
в .....

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

**FXS** – Fragile X syndrome

**FRAXA (FraXA)** – Fragile X syndrome A

**FRAXE (FraXE)** – Fragile X syndrome E

**RTT** – Rett syndrome

**PWS** – Prader-Willi syndrome

**AS** – Angelman syndrome

**MDS** – Microdeletion syndromes, микроделеционни синдроми

**WBS** – Williams-Beuren syndrome

**WHS** – Wolf-Hirschhorn syndrome

**DGS** – DiGeorge syndrome

**UPD** – Uniparental disomy

**ISSX1, ISSX2** - X-linked dominant infantile spasm syndrome-1 and 2

**FMR1** – Fragile X mental retardation 1 gene

**FMR2** – Fragile X mental retardation 2 gene

**FMRP** – Fragile X mental retardation protein

**ARX** – Aristaless X

**MECP2** – Methyl-CpG-binding protein 2 gene

**MeCP2** – Methyl-CpG-binding protein 2

**CDKL5** – Cyclin-dependent kinase like 5 gene

**FOXP1** - Forkhead G1 gene

**SNRPN** – Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N gene

**UBE3A** - Ubiquitin-protein ligase E3A gene

**MLPA** - Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

**MS-MLPA** - Methylation Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

**ДНК** – дезоксирибонуклеинова киселина

**РНК** – рибонуклеинова киселина

**PCR/ПВР** – Polymerase chain reaction, полимеразна верижна реакция

**MS-PCR** – Methylation specific PCR

**кб** – килобази

**бд/bp** – базови двойки, base pair

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b>	<b>5</b>
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b>	<b>8</b>
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b>	<b>10</b>
<b>РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ</b>	<b>12</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>47</b>
<b>ИЗВОДИ</b>	<b>50</b>
<b>БИБЛИОГРАФИЯ</b>	<b>51</b>
<b>ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ</b>	<b>52</b>
<b>ПРИНОСИ</b>	<b>55</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>56</b>

## ВЪВЕДЕНИЕ

Умственото изоставане в детска възраст се среща с честота около 2-3% в развиващите се страни [Leonard and Wen, 2002]. За централна Европа честотата на „умствената инвалидизация” се оценява на около 8% [Polder et al., 1998]. Това е една от най-честите причини за насочване към генетична консултация и последващи генетични изследвания. В същото време тази патология при голям процент засегнати остава един от най-важните неизяснени проблеми в съвременното здравеопазване. В резултат на това, на засегнатите семейства не може да бъде предложено адекватно генетично консултиране и репродуктивно планиране чрез пренатална диагностика. Леки форми на умствено изоставане (т.е. интелектуален квотиент (IQ, intellectual quotient) между 50 и 70) се смята, че в повечето случаи се дължат на взаимодействието на много гени и намесата на негенетични фактори. За разлика от тези форми, тежките форми (т.е. IQ<50) се дължат на катастрофални събития като перинатална хипоксия или намесата на специфични генетични фактори, като хромозомни аберации или мутации в специфични гени [Ropers, 2006].

Умственото изоставане е значително по-често при мъже, отколкото при жени [Penrose, 1938; Wright et al., 1959; Priest et al., 1961]. Това наблюдение, както и наличието на огромен брой описани големи фамилии с X-свързан модел на умствено унаследяване доведе до предположението, че X-свързани генни дефекти играят важна роля в етиологията на умственото изоставане [Lehrke, 1972; Lehrke, 1974]. На базата на огромно количество клинични данни и генетични проучвания за локусна скаченост в зесегнати фамилии се установи, че X-свързаното умствено изоставане (ХСУИ) е изключително хетерогенна характеристика. Най-честата форма на наследствено X-свързано умствено изоставане е синдромът на чуплива X хромозома (Fragile X-syndrome, FXS, OMIM#309550) с честота 1:4000 момчета [Turner et al., 1996]. В последствие беше идентифициран регионът от X-хромозомата, който е засегнат при FraX, това е дисталният регион от дългото рамо на X-хромозомата, където беше картиран и клониран генът FMR1 (fragile X-mental retardation 1, OMIM#309550). FXS се дължи на експанзия на нестабилен CGG повтор в 5'UTR на гена FMR1. Полиморфният CGG повтор наброява 6 до 54±2 копия при нормални индивиди, 55±2 до 200 копия при здрави носители на премутация и >200 копия при FXS пациенти.

Това е първият идентифициран ген на X-хромозомата, свързан с умствено изоставане. Оттогава броят на идентифицираните гени на X-хромозомата, свързани с ХСУИ нараства експоненциално. Особено голям прогрес се наблюдава в областта на

несиндромното или „чиста” форма умствено изоставане, което всъщност представлява огромна група заболявания, които са клинично неразличими, тъй като изоставане в усвояването и обучението са единствен симптом на заболяването.

Синдром на Rett (RTT, OMIM#312750) е най-честата причина за X – свързано умствено изоставане при момичета. Честотата на заболяването е 1:10 000, 1:15 000 [Hagberg et al., 1997]. Класическите форми на Rett синдром се причиняват в 90-95% от случаите от мутации в MECP2 гена (метил CpG-свързващ протеин 2, OMIM#300005). Малък процент от случаите ~10% се причиняват от мутации в гена CDKL5 (циклин-зависим кинозо подобен белтък 5, OMIM#300203). Мутации в тези два гена са отговорни и за изява на атипични форми Rett синдром.

Към Rett подобни синдроми се включват други форми X – свързано умствено изоставане, като West синдром (ISSX; OMIM#308350), infantile spasms синдром (OMIM#308350), X-свързан аутизъм и др. West синдромът се дължи на мутации в ARX (Aristaless X, OMIM#300382) гена, докато infantile spasms синдромът се причинява от дефекти в CDKL5 гена. Мутации в ARX гена са описани при момчета с умствено изоставане и епилепсия. Мутации в MECP2 гена се смятаха за летални при момчета (в хемизиготно състояние), но в последно време има открити такива мутации при момчета с първоначална клинична диагноза синдром на чуплива X хромозома [[www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM)].

Освен X-свързаните форми на умствено изоставане, някои автозомни мутации също водят до синдроми с умствено изоставане и до известна степен припокриваща се симптоматика с X свързаните синдроми. Например синдромите на Prader-Willi/Angelman (PWS/AS, OMIM#176270; 105830), които се дължат на делеция на 15-та хромозома (15q11-q13) или унипарентна дизомия (uniparental disomy, UPD) 15, могат клинично да се припокриват в някои аспекти с FXS или RTT синдром. В PWS/AS критичния регион на 15-та хромозома се съдържат импринтвани гени (експресирани само от майчиния или бащиния геном), като регулацията се извършва на принципа на специфично метилиране на неактивното копие. CpG островите около екзон 1 на SNRPN гена са метилирани върху майчината хромозома (неактивна) и напълно неметилирани върху бащината хромозома (активна). Това откритие е използвано при разработването на диагностични методи за PWS/AS. При пациент от мъжки пол PWS може да има някои общи клинични аспекти с FXS, докато при пациент от женски пол има припокриване с RTT.

В допълнение, голям брой делеции върху различни хромозоми и гени са също асоциирани с умствено изоставане и формират групата на микроделеционните

синдроми - МДС (microdeletion syndromes, MDS). В настоящия дисертационен труд са представени William-Beuren синдром и Wolf-Hirschhorn синдром.

William-Beuren синдром (WBS) се причинява от хемизиготна делеция на няколко последователни гени от 7-ма хромозома (7q11.23). Първоначално е докладвана делеция, покриваща еластиновия ген ELN (OMIM#130160) [Ewart et al., 1993]. В следствие се установява, че тази делеция покрива много по-голям регион. Тежестта на умственото изоставане и проявата на различни симптоми, свързани със синдрома зависят от големината на делецията и гените попадащи в делецията. В допълнение към еластиновия ген, генът кодиращ LIM киназа (LIMK1; OMIM#601329) се оказва също делетиран при пациенти с WBS [Tassabehji et al., 1996]. Този ген се експресира преимуществено в мозъка и е пряко свързан със степента на умствено изоставане и когнитивните нарушения при пациентите с WBS, докато делеция на еластиновия ген е пряко свързана със сърдечно-съдовите нарушения.

Wolf-Hirschhorn синдром (WHS) се причинява от хемизиготна делеция на дисталното късо рамо на 4-та хромозома (4p16.3). Gandelman и сътр. [1992] описват 4p делеция при пациент с WHS, като тази делеция обхваща приблизително 2.5 Мб. Малко по-късно е картиран WHS критичният регион 1 (WHS critical region, WHSCR1), който покрива 165 кб, на около 2 Мб от теломера [Wright et al., 1997]. В следствие се оформя и втори критичен регион за WHS, покриващ 300- до 600-кб интервал от 4p16.3 региона (WHSCR2; 1.9 Мб от теломера). Към вече известните гени във WHS региона на 4-та хромозома се причислява генът LETM1 (OMIM#604407), който най-вероятно е отговорен за гърчовата симптоматика при това заболяване.

Настоящият дисертационен труд е насочен към изясняване на молекулните характеристики на различни синдроми с умствено изоставане в България. Основна цел беше въвеждането на нови, надеждни и информативни методи за молекулярно-генетична диагностика на болести, свързани с умствено изоставане и с помощта на тези методи изясняването на молекулните основи на тези болести в България. В използваните методики бяха направени и редица собствени нововъведения. Голяма група пациенти с различна клинична симптоматика бяха подложени на широк спектър генетични изследвания, в резултат на което 31% бяха генетично охарактеризирани. Останалата група генетично неизяснени пациенти бяха подготвени за бъдещи проучвания на геномно ниво, с помощта на навлизащите нови методи за анализ като микрочипове, секвениране от нова генерация и др.

Настоящото проучване постави началото на молекулярно-генетичната диагностика на синдроми с умствено изоставане в България.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**ЦЕЛ** на настоящия дисертационен труд е изясняване на молекулните характеристики на синдроми, свързани с умствено изоставане, за диагностика и профилактика в засегнатите семейства.

### ЗАДАЧИ

#### 1. FXS

- Въвеждане и оптимизиране на методи за анализ на CGG експанзията в FMR1 гена.
- Приложение на разработените методи за диагностика при група български пациенти с FXS и техните семейства.
- Провеждане на допълнителни изследвания в други гени при генетично неизяснените пациенти.

#### 2. RTT

- Въвеждане и оптимизиране на методи за анализ на гени, мутации в които са свързани с RTT.
- Разработване на математически алгоритъм за оценка на големи делеции/дупликации, детектирани чрез MLPA.
- Приложение на разработените методи за диагностика при група пациенти с RTT.
- Изработване на системен подход за молекулярно-генетична диагностика при пациенти с RTT.
- Провеждане на допълнителни изследвания в други гени при генетично неизяснените пациенти.
- Сравнение на получените резултати с публикуваните данни. Модели на мутагенеза.

### **3. PWS/AS**

- Въвеждане и оптимизиране на методи за анализ на делеции и унипарентна дизомия в региона на 15-та хромозома (15q11-q12).
- Приложение на разработените методи за диагностика при група български пациенти с PWS/AS.
- Провеждане на допълнителни изследвания в други гени при генетично неизяснените пациенти.
- Сравнение на получените резултати с публикуваните данни

### **4. MDS**

- Въвеждане и оптимизиране на метод за анализ на микроделеционни синдроми.
- Приложение на разработения метод за диагностика при български пациенти с WBS, WHS, DGS.

### **5. Обобщение на получените резултати**

## МАТЕРИАЛИ

### 1. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ – 90 пациента

- 32 момчета са с клинична диагноза синдром на чуплива X хромозома;
- 38 момчета са с клинична диагноза Rett синдром;
- 13 пациенти с клинична диагноза PWS;
- 3 пациенти с клинична диагноза AS;
- 2 пациенти с клинична диагноза Williams-Beuren синдром;
- 1 пациенти с клинична диагноза Wolf-Hirschhorn синдром;
- 1 пациенти с клинична диагноза DiGeorge синдром;

### 2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ - ДНК

## МЕТОДИ

### 1. ПРЕДАНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

- 1.1. Изолиране на ДНК
- 1.2. Бисулфитно конвертиране на ДНК

### 2. АНАЛИТИЧНА ОБРАБОТКА НА МАТЕРИАЛА

- 2.1. Полимеразна верижна реакция (ПВР; Polymerase chain Reaction; PCR) на следните гени:
  - FMR1
  - MECP2
  - CDKL5
  - ARX
  - SNRPN
- 2.2. Електрофореза в агарозен гел
- 2.3. Изолиране на амплифицирани фрагменти от агарозен гел:
- 2.4. Електрофореза за фрагментен анализ на автоматичен секвенатор
- 2.5. Електрофореза в денатуриращ акриламиден гел, Southern трансфер и последваща хибридизация със специфична сонда.
- 2.6. Директно секвениране по Sanger с флуоресцентно белязани дидезокси нуклеотиди.

- 2.7. Мултиплексна лигазно зависима амплификация (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA).
- 2.8. Разработване на подходящ математически алгоритъм за количествена оценка на получените резултати
- 2.9. Разновидност на мултиплексна лигазно зависима амплификация - специфичен по отношение на метилирането MLPA анализ (Methylation Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MS-MLPA).

● **Използвани MLPA китове в дисертационния труд:**

SALSA MLPA ME029 FMR1/FMR2 probemix

SALSA MLPA Kit P015C - MECP2

SALSA MLPA Kit ME028-A1 - PWS/AS

SALSA MLPA Kit P245 - A1 Microdeletion Syndromes

[[www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)]

● **Литературни база данни, използвани в проучването**

При секвенционния анализ на изследваните гени, разчетената от нас секвенция се сравнява с публикуваната за всеки ген в GenBank базата данни. Използваните генни секвенции в настоящето проучване имат следните регистрационни номера: X99686 (MECP2), NM\_001037343 (CDKL5), NM\_139058 (ARX).

За сравнителния анализ на откритите мутации при български пациенти с публикуваните данни в литературата са използвани редица проучвания на други автори, цитирани в раздел „Резултати и Обсъждане“. Използвана е мутационната база данни: [www.mecp2.chw.edu.au](http://www.mecp2.chw.edu.au).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Групата от пациенти с умствено изоставане, която представлява обект на молекулярно-генетични изследвания в настоящия дисертационен труд се състои от 90 пациента. На базата на предварително проведените клинични изследвания те са разделени в 4 групи: FXS 32-ма пациента, RTT 38 пациента, PWS/AS 16 пациента и MDS 4-ма пациента. Резултатите от клинично-генетичните изследвания са представени в 2 публикации [Todorov et al., 2010a,b].

### **1. FXS:**

#### **1.1. КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ**

Водеща клинична находка при всички момчета от тази група е липсващ или забавен говор (в случаите на забавен говор се касае за речев състав състоящ се от отделни думи или срички). Интелектуалното развитие при всички момчета е забавено, като в тази група се срещат широки вариации в степента на умствено изоставане: от тежка (IQ=20-34) до гранична (IQ=70-80). Тези вариации в степента на умствено изоставане се дължат на наличието на пациенти с чисто аутистично поведение и дискретни синдромни изменения, които подлежат на изключване на FXS като евентуална диагноза.

При всички пациенти от изследваната група са налице дисморфични лицеви характеристики като характерните за тази диагноза големи ниско разположени ротирани назад ушни миди, удължено лице, високо чело, големи раздалечени зъби, високо небце, коси очни цепки, екстравертирани ноздри и др.

Поведенческите отклонения не са характерни за всички пациенти от изследваната група. В някои случаи се наблюдава аутистично поведение и избягване на очен контакт. В други случаи децата проявяват хиперактивност и са склонни към агресия.

Забавяне във физическото развитие също не е характерно за всички пациенти от изследваната група - наблюдава се при 6 пациента: висока несъразмерна фигура с удължени ръце и крака, хипертрофия на прасците, мускулна хипотония, забавена възможност за самостоятелно седене (около 9м. – 1г.), самостоятелно прохождение (1г6м – 3г.).

При 4 от изследваните момчета са налице епилептични припадъци или единични гърчови епизоди.

Родителите на децата от тази група често свързват появата на патологичната симптоматика с прекарано тежко заболяване като коклюш, пневмония, рецидивиращи отити и др. Често родителите споменават прекарани инфекциозни заболявания като причина за последващ регрес в развитието на техните деца.

## **1.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

Системният подход при молекулярно-генетичен анализ на момчета с умствено изоставане предполага като първа стъпка да бъде проверен FMR1 генът за патологични нарушения.

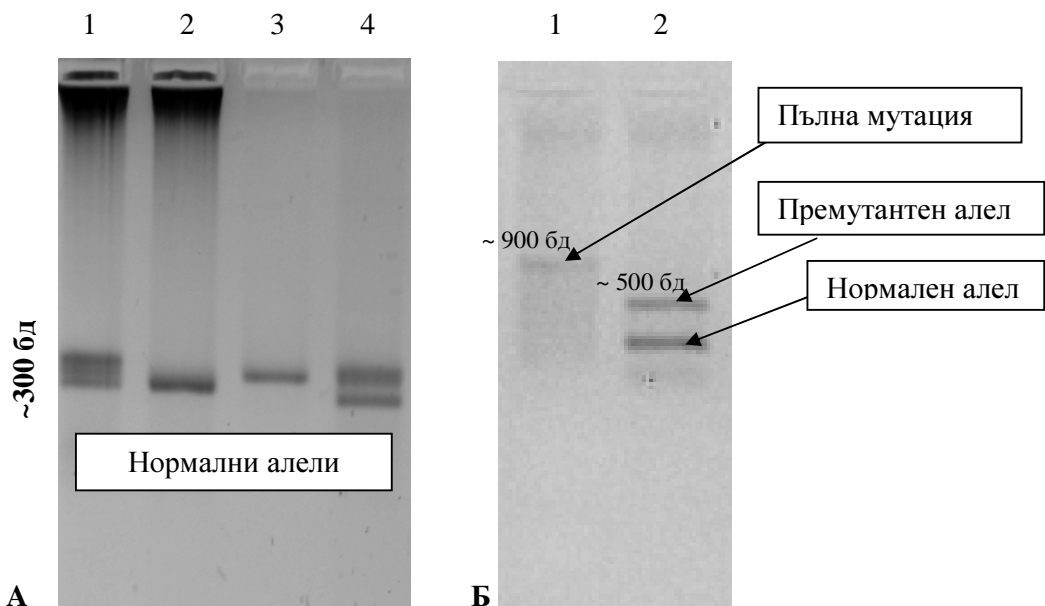
Използвана методика за анализ на FMR1 гена при български пациенти:

- 1.** Амплификация на региона, съдържащ CGG повтора в промоторната област на FMR1 гена

Поради CG съставът на интересуваният ни за анализ генен регион, неговото амплифициране чрез стандартен PCR протокол е невъзможно. За целите на настоящия дисертационен труд и за молекулярно-генетичната диагностика на синдром на чуплива X хромозома в България беше разработен и оптимизиран за рутинно диагностично изпълнение PCR протокол с висока концентрация на бетаин (модификация на протокола на Tassone et al., [2008]). Тази новаторска разработка на екипа беше публикувана в *Molecular Biotechnology* [Todorov et al., 2010c]. Бетаинът подобрява амплификацията на GC-богати ДНК секвенции, тъй като намалява формирането на вторични структури в този регион. Ако прицелната GC-богата ДНК последователност е много дълга (както в нашия случай), формирането на такива вторични структури (hairpin loops) е много често събитие, което прави матрицата недостъпна за действието на полимеразата в хода на амплификационната реакция. Експериментално беше установено, че добавянето на бетаин във вид на монохидрат (Sigma) не пречи на действието на ДНК полимеразата, както и на специфичността и акуратността на PCR реакцията [Henke et al., 1997].

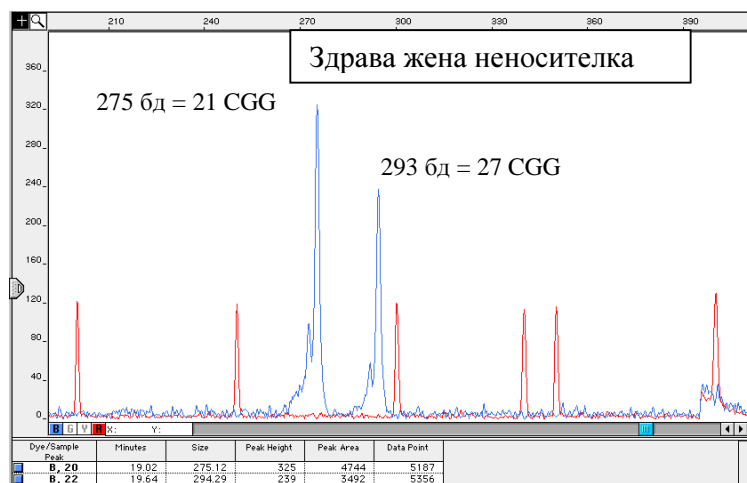
Освен това с увеличаване концентрацията на бетаин се увеличава и интензивността на получения амплификационен продукт [Henke et al., 1997].

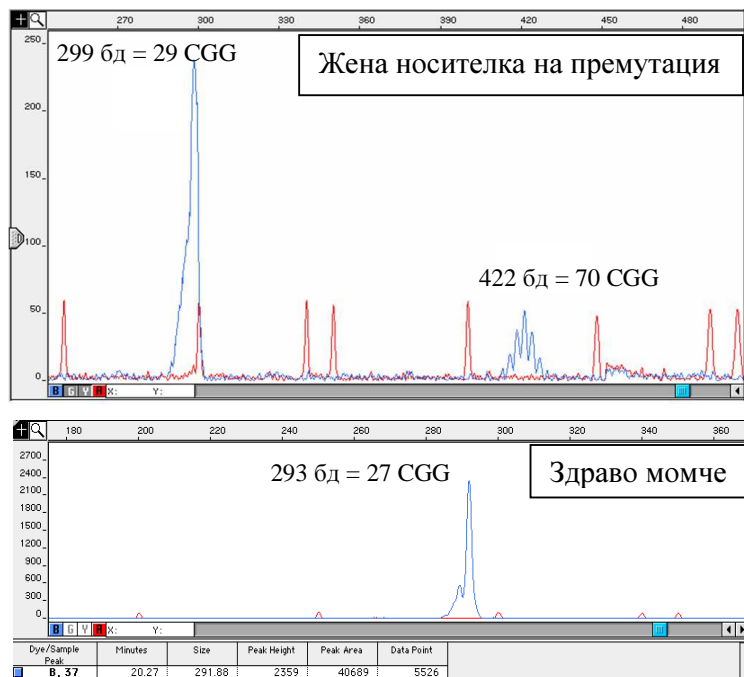
Първоначално разработеният протокол за амплификация беше приложен върху контролна група ДНК проби – 5 здрави момчета, 2 болни момчета с доказана пълна мутация, 5 здрави жени носители и 6 жени носители на премутация. Резултатите се визуализират чрез агарозна електрофореза с детекция етидиев бромид. На този етап се оценява дали амплификацията е била успешна и грубо може да се прецени размера на получените амплификационни продукти (Фигура 1).



**Фигура 1. Електрофоретични профили на PCR продукти на CGG повтора в FMR1 гена: (А)** Здрави жени носителки - 1; 4; здрави момчета - 2; 3 и **(Б)** болно момче - 1; жена носителка на премутация - 2. Дължината на фрагментите е определена спрямо молекулен стандарт с известни размери на фрагментите, който не е представен на фигурата.

В следствие за по-точно оразмеряване на получените фрагменти, амплификационните продукти бяха анализирани и чрез капилярна електрофореза на ABI310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Фигура 2).





**Фигура 2. Електрофоретични профили на PCR продукти на CGG повтора в FMR1 гена, анализирани чрез капилярна електрофореза.** Сините пикове представляват фрагментите от амплифицирания CGG повтор, а червените пикове са молекулен стандарт, спрямо който се извършва оразмеряването на фрагментите. Премутантни експандирани алели, които представляват мозайка от фрагменти, различаващи се с по един тринуклеотид, се детектират като поредица от пикове както се вижда от профила на премутантния алел 70 CGG повтора.

Предимство на разработения от нас диагностичен протокол за размножаване CGG повтора в промоторната област на FMR1 гена е неговата бързина на изпълнение и изключителна надеждност при амплификация на фрагменти до около 150 CGG повтора. Този бърз тест, разработен като скринингов метод позволява получаване на резултат в рамките на 24 часа. Протоколът не изисква симултаният анализ на контролни проби с анализиранията проба, тъй като всеки получен амплификат се оразмерява директно от автоматичния секвенатор и в следствие се интерпретира като брой повтори съгласно разработените от нас калкулации, представени в Таблица 1.

Това намалява себестойността на анализа. Друго много съществено предимство е използването на много малко количество ДНК – 200 ng, за разлика от класическите методи на Southern хибридизация, където са необходими 5-10 µg ДНК. Това предимство прави метода приложим и за целите на пренаталната диагностика.

Недостатък на представения протокол е невъзможността за размножаване/визуализиране на експанзии по-големи от 150 CGG повтора. Това налага комбинирането на PCR протокола с допълнителен метод за анализ. Това неудобство се налага само при около 13% от изследваните при нас семейства, останалите 87% от случаите (деца с нормален алел, майки хетерозиготи с два нормални алела, носители на

малки премутации) бяха изяснени успешно още с първата стъпка на амплификация на CGG повтора.

**Таблица 1. Изчисления на CGG повторите спрямо размера на амплификационните продукти в базови двойки (бд).**

Размер*[бд]	Брой CGG повтори
287	25
290	26
293	27
296	28
299	29
302	30
.....	.....
422	70
.....	.....
482	90
.....	.....
512	100
.....	.....
572	120

\*Константният регион е 212 бд.

## 2. MS-MLPA

Като допълнителен метод за анализ на FXS семействата беше избран нов модерен подход MS-MLPA, оценяващ метилирането в промоторната област на FMR1 гена. По този начин индиректно се идентифицират много големи експанзии, водещи до хиперметиране. С помощта на този метод е възможно и откриването на големи делеции/дупликации в FMR1 гена, които макар и рядко може да са причина за синдром на чуплива X хромозома.

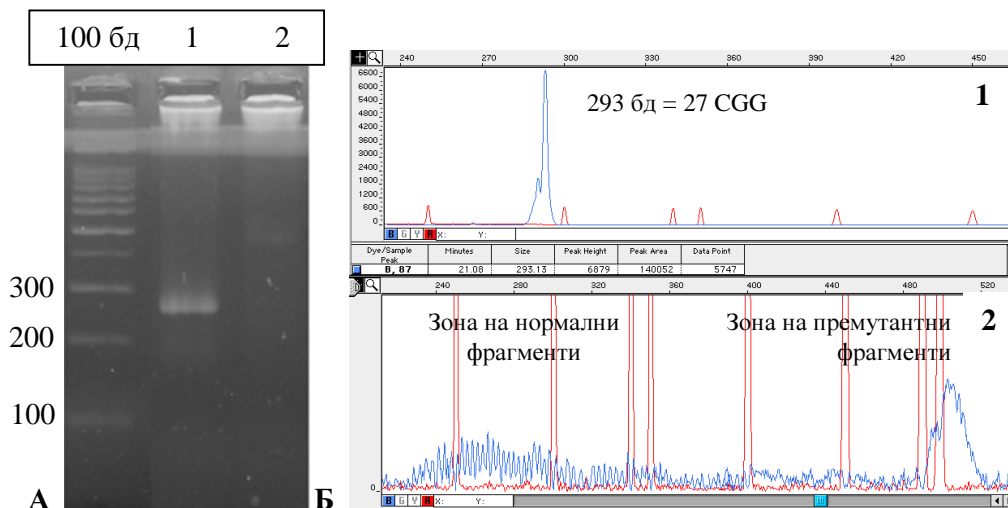
Този метод дава възможност в допълнение да се диагностицират случаи на FXSE (FraXE, FMR2 гена), което го прави много подходящ за диагностика на всички възможни варианти на синдром на чуплива X хромозома. Анализирани от нас гени (FMR1 и FMR2) са разположени на X хромозомата, поради което откриването на делеции в тези гени при пациенти от мъжки пол е лесно, тъй като води до липса на фрагмент от електрофоретичния профил. Наличието на дупликации при пациенти от

мъжки пол води до двойно по-висок пик за дублицирания фрагмент(и) в сравнение с нормална контрола. В този случай се изисква извършването на математически калкулации за количествена оценка на получените генни фрагменти. По-високите пикове се калкулират спрямо контрола, като получено съотношение  $>1.6$  се интерпретира като дубликация.

Използваната от нас MS-MLPA методика за анализ на пациенти със синдром на чуплива X хромозома е публикувана в BMJ Case Report [Todorov et al., 2009].

### 1.3. РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА МОМЧЕТА:

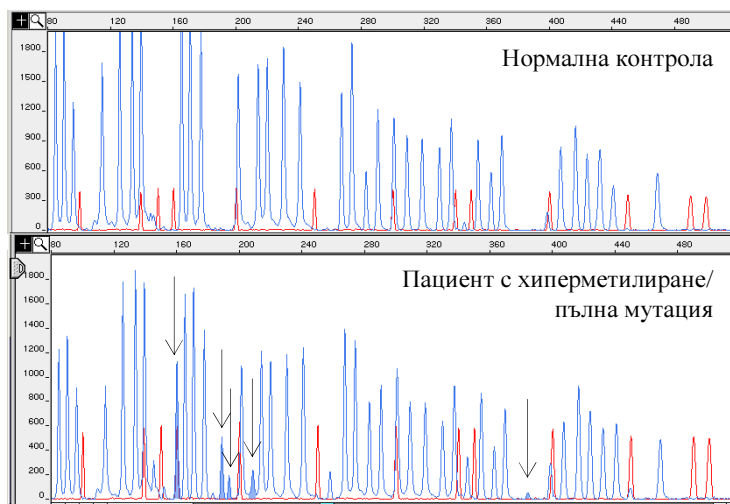
Всички пациенти от изследваната група и техните майки бяха подложени първо на PCR амплификация с описания по-горе бетаин обогатен протокол. В допълнение всички пробанди бяха изследвани и с MS-MLPA за оценка на хиперметиране в промоторната област на FMR1 гена, делеции и дубликации в този ген и евентуални отклонения в FMR2 гена (FraXE). При трима пациенти не беше получен амплификационен продукт в зоната на нормалните CGG повтори на агарозна електрофореза (Фигура 3А). Капилярната електрофореза при двама от пациентите също показва липса на нормални фрагменти, докато при един пациент беше наблюдавана динамична мутация, мозаичен профил - нормални фрагменти/премутантни фрагменти/пълна мутация (Фигура 3Б).



**Фигура 3. Електрофоретичен профил на PCR продукт на CGG повтора в FMR1 гена при:**  
 1-майка носителка на премутация (1 нормален алел) и 2-болно момче, носещо динамична мутация (нормални фрагменти/ премутантни фрагменти/пълна мутация).  
 (А)-агарозна електрофореза; (Б)-капилярна електрофореза.

При майките на тези пациенти беше установено наличието само на един нормален CGG фрагмент и един увеличен алел (премутация) с размери съответно около 70, 90 и >150 CGG повтора (виж Фигура 2).

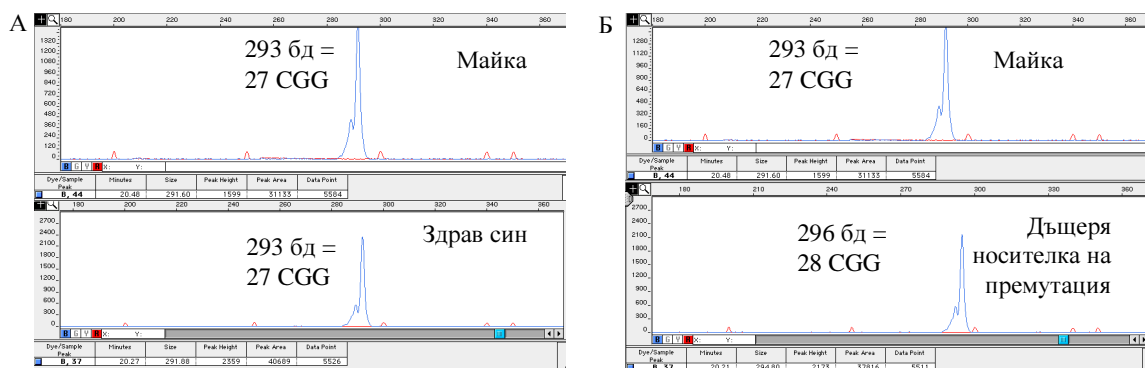
MS-MLPA анализът показва наличието на хиперметиране в промоторната област на FMR1 гена при тримата пациенти (Фигура 4), което напълно потвърждава наличието на пълна мутация (експанзия >200 CGG повтора).



**Фигура 4. MS-MLPA профил за анализ на FXS.** След рестрикция с чувствителна към метилиране рестриктаза Nha I при пациент носител на пълна мутация се появяват 5 фрагмента (посочени със стрелки) поради хиперметиране на промоторната област на FMR1 гена. При нормална контрола тези 5 неметиранни фрагмента се срязват от рестриктазата и липсват като амплификационен профил.

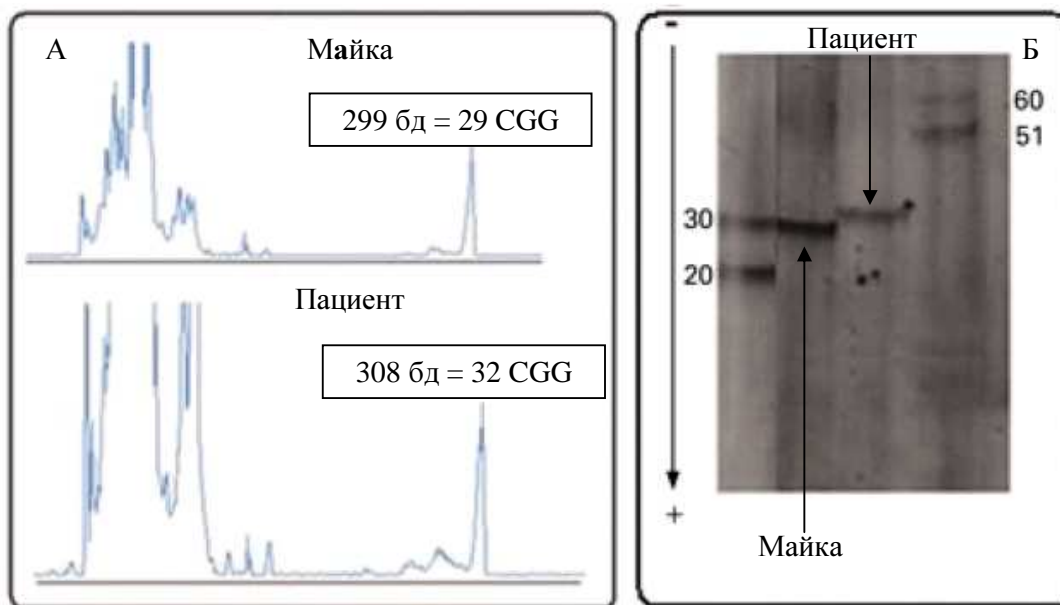
Наблюдаваната динамична мутация при един от нашите пациенти представлява мозайка от нормални фрагменти/премутантни фрагменти/пълна мутация. Тази мутация е резултат от унаследяване на майчиния нестабилен премутантен алел, като най-вероятно този нестабилен алел претърпява множество делеции/експанзии в рамките на самия CGG повтор. Тежестта на наблюдаваната клинична симптоматика при пациент с такъв тип генен дефект би трябвало да зависи от пропорцията на нормалните алели спрямо алелите с пълна мутация в клетките на централната нервна система и мозъка.

Майката на един от генетично доказаните FXS пациенти носи един нормален алел с размер 27 CGG повтора и един премутантен алел с размер 70 повтора (виж Фигура 21). В това семейство бяха изследвани и здравите брат и сестра на пробанда. Генетичният анализ показва, че здравото момче е унаследило от майка си нормалния фрагмент с размер 27 CGG повтора. Сестрата на пробанда не носи здравия майчин алел (наблюдава се загуба на майчин алел, Фигура 5), което показва че тя е унаследила от майка си премутантния алел и има риск 50% да предаде този дефект в поколението си (50% болни момчета и 50% момичета носителки на премутация/пълна мутация).



**Фигура 5. Електрофоретичен профил на PCR продукт на CGG повтора в FMR1 гена при майката, здравия брат и сестра носителка.**

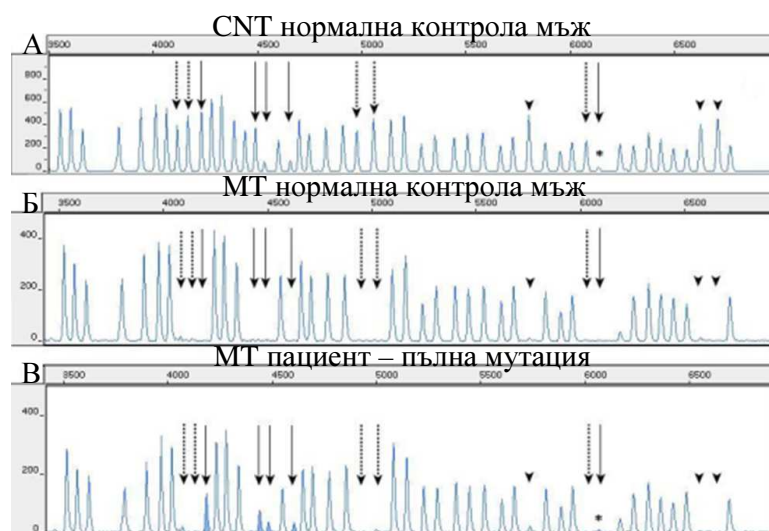
Интерес представлява и друго от доказаните FXS семейства, където резултатът от PCR анализа при майката показва наличието на един нормален алел  $29 \pm 1$  CGG повтора, а при сина показва също наличието на един CGG повтор в зоната на нормалните фрагменти. Прецизното оразмеряване на нормалния фрагмент при болното момче на автоматичен секвенатор показва, че неговият повтор е в зоната на нормата, но с три CGG повтора по-тежък ( $32 \pm 1$  CGG) от нормалния фрагмент на майката (Фигура 6А). Резултатът е потвърден чрез PCR/Southern хибридизация (Фигура 6Б).



**Фигура 6. (А) Капиллярна електрофореза на PCR продукт на CGG повтора в FMR1 гена. (Б) PCR/хибридизация по Southern на CGG повтора в FMR1 гена.**

MS-MLPA анализът при пациента показва наличието на хиперметиране в промоторната област на FMR1 гена (Фигура 7). Този резултат потвърди

предположението, че се касае за мозайка от нормален фрагмент и пълна мутация при изследвания пациент.



**Фигура 7. MS-MLPA профил.** Непрекъснатите стрелки посочват специфичните по отношение на метилирането сонди в FMR1 гена. Прекъснатите стрелки посочват специфичните по отношение на метилирането сонди в FMR2 гена. Триъгълниците посочват контролни за рестрикцията фрагменти. (А) Тест на брой копия (CNT) при нормален индивид от мъжки пол. (Б) Тест за метилиране при нормална контрола мъж. (В) Тест за метилиране при пациент с пълна мутация.

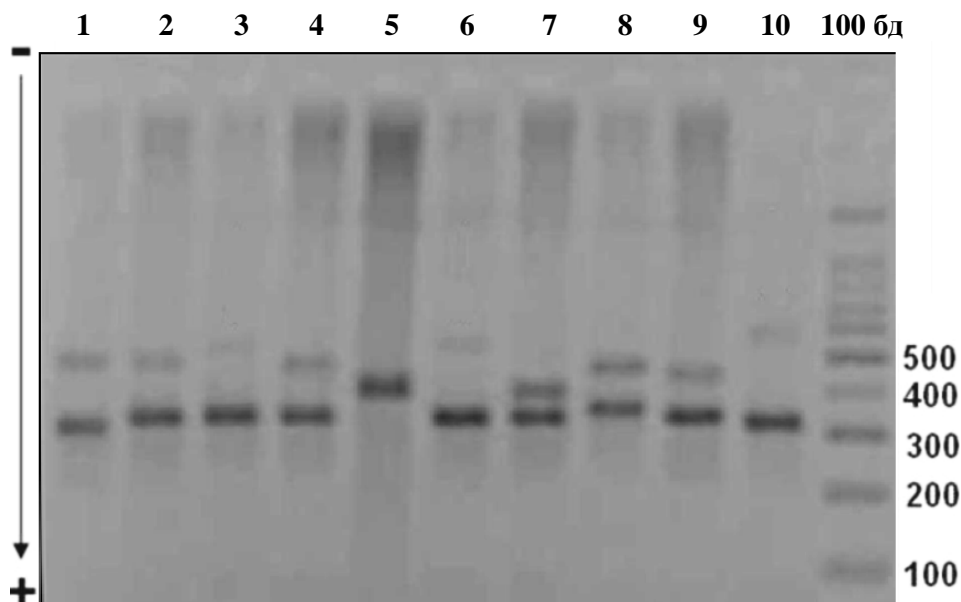
Всички специфични по отношение на метилирането фрагменти (посочени с различните стрелки) липсват в резултат на рестрикцията с *NhaI* при нормална контрола мъж. Петте FMR1 екзон 1, специфични по отношение на метилирането сонди дават амплификационни фрагменти при пациента (пиковите са маркирани в синьо), като резултат от хиперметиране и не са подложени на рестрикция от *NhaI*. Останалите, специфични по отношение на метилирането фрагменти за FMR2 и контроли на рестрикцията липсват при пациента, което показва че рестрикцията е успешна и няма хиперметиране по дължината на FMR2 гена.

Резултатът от молекулярно-генетичния анализ напълно съвпада с наблюдаваната лека клинична симптоматика при този пациент, което най-вероятно се дължи на наличието на нормален CGG алел в клетките на пациента. Пробандът към датата на изследването е 23 годишен с интелектуални нарушения от ранна детска възраст, но без физически отклонения и лицев дисморфизъм. Няма забавяне в говора, но речевия състав е доста ограничен. Имал е проблеми с обучението от ранна детска възраст, трудно поддържа очен контакт и се забелязва дефицит на внимание. Завършил е училище за проблемни деца. По отношение на поведенческите отклонения рядко се забелязват хиперактивност и агресия. В момента работи като общ работник на строителни обекти и по думите на майката е самостоятелен и се справя добре.

Този случай на мозайка нормален алел/пълна мутация беше описан подробно в BMJ Case Report [Todorov et al., 2009]. По наше мнение, мозаечният модел на нормален алел с пълна мутация е резултат от унаследяване на майчиния нестабилен премутантен алел, като най-логичният механизъм за възникване на нормалния алел е делеция (регресия) на пълната мутация в рамките на самия CGG повтор, тъй като използваните от нас PCR праймери бяха дизайнирани във фланкиращите региони на повтора [Nolin et al., 1994; Mila et al., 1996; Schmucker & Seidel, 1999; Grasso et al., 1999]. До момента в световната литература има само един публикуван случай на регресия на майчина премутация до нормален алел без да е мозайка с премутация или пълна мутация, което води до здраво момче [Tabolacci et al., 2007]. Предполага се че тези случаи може да не са толкова редки в природата, но да остават неизвестни поради липса на клинична симптоматика.

Описаният в настоящата работа мозаечен случай е първата публикация за успешното приложение на MS-MLPA анализа за диагностични цели при FXS. В допълнение нашите резултати показаха, че комбинираното приложение на PCR с MS-MLPA дава възможност в няколко стъпки да се диагностицират нормални FMR1 алели, да се предвидят експанзии, да се оцени метилирането на CpG островите в промоторната област на FMR1 гена, както и да се открият големи делеции и дупликации по дължината на FMR1 и FMR2 гените. Освен това, нашият опит с приложението на тези методики при диагностика на FXS пациенти, показва че те могат да се използват успешно и за диагностика на мозаечни случаи, които са доста честа находка при синдром на чуплива X хромозома. Нашият опит в молекулярно-генетичната диагностика на синдром на чуплива X хромозома показва, че не е правилно да се изследва пациент за FXS без неговата майка. В конкретния случай на мозаечен пациент с нормален алел и пълна мутация, ако беше изследван само пациента наличието на нормален алел можеше да доведе до грешна интерпретация на резултатите. Освен това, при всички пациенти задължително се провежда и анализ за метилиране чрез MS-MLPA, независимо от предварителния резултат от амплификацията.

Използването на представения по-горе PCR протокол е подходящо за скринингови цели при жени, интересувани се от носителския си статус, защото нормалните алели и премутациите се детектират успешно с амплификационния анализ и агарозна електрофореза с визуализация – етидиев бромид (Фигура 8).



**Фигура 8.** Агарозна електрофореза на PCR продукти на CGG повтора в FMR1 гена при жени носители на премутация. Генотиповете на представените проби, предварително оразмерени с капилярна електрофореза са: 1-21/74 CGG; 2-25/75 CGG; 3-29/~90 CGG; 4-29/70 CGG; 5-50/56 CGG; 6-26/~90 CGG; 7-29/50 CGG; 8-35/67 CGG; 9-29/62 CGG; 10-28/~100 CGG.

В допълнение MS-MLPA анализът е подходящ за скринингови програми при новородени момчета, тъй като открива само пълни мутации, свързани с клинична изява и изпуска премутациите, които нямат клинична симптоматика.

От изследваните 32 семейства с диагноза FXS при 4 семейства (12,5%) диагнозата беше верифицирана на молекулярно ниво. Получените резултати от ДНК анализа при три семейства бяха потвърдени в Leuven, Belgium.

#### **1.4. ДОПЪЛНИТЕЛНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ГЕНЕТИЧНО НЕИЗЯСНЕНИТЕ ПАЦИЕНТИ**

Останалите пациенти са с неясна диагноза. При тях бяха проведени допълнителни молекулно-генетични изследвания, в зависимост от наблюдаваната съпътстваща клинична симптоматика. При пациентите с епилептична симптоматика беше изследван ARX генът, мутации в който водят до подобен вид клиника [Stromme et al., 2002; Mandel and Chelly, 2004].

В литературата бяха описани мутации в MECP2 гена при момчета, като причина за леко умствено изоставане в комбинация със затлъстяване, клинична симптоматика, припокриваща се с PWS (виж по-надолу текста) [Kleefstra et al., 2002].

При тази група пациенти не бяха открити мутации в ARX и MECP2 гените.

При тримата пациента със съпътстваща диагноза PWS/AS, бяха проведени и молекулярно-генетични изследвания за PWS/AS (виж по-надолу текста), но и тези

тестове не доведоха до изясняване на диагнозата. Някои пациенти бяха изследвани и с MLPA кита за микроделеционни синдроми (виж по-надолу текста), но не бяха открити патологични изменения.

Въпреки проведеният широк спектър молекулярно-генетични изследвания в групата момчета с умствено изоставане и предполагаема клинична диагноза FXS, голям процент от тях останаха с неизвестен генетичен дефект. Причина за това, от една страна, е смесеният характер на изследваната група, в която попадат и пациенти с чисто аутистично поведение и дискретни синдромни изменения, при които целта на теста е по-скоро изключване на диагноза FXS. От друга страна, става ясно че умственото изоставане при момчета е полигенно детерминирано, като мутации в X-свързани и автозомни гени са отговорни за сходна клинична симптоматика. Нашата група пациенти с все още неизвестен молекулен дефект представляват обект за нови проучвания за търсене на нови гени и локуси, мутации в които водят до умствено изоставане. Тези пре-скринирани пациенти, при които са изключени най-честите възможни генетични причини, са подходящи и за научни проучвания с микрочипов анализ. Имайки предвид високата себестойност на тестовете от нова генерация, анализиращи целия геном, от изключителна важност е пациентите да бъдат предварително скринирани за най-честите известни генетични причини и да се изключат тези, които се дължат на дефекти във вече известни гени.

## **2. RTT**

### **2.1. КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА МОМИЧЕТА С ДИАГНОЗА RETT СИНДРОМ**

Изследваните момчета с клинична диагноза RTT бяха разпределени в две групи на базата на клиничната симптоматика: с класически Rett синдром и с атипичен Rett синдром. Степента на умствено изоставане в тази група пациенти варира от лека (IQ=50-69) до много тежка (IQ<20). Като съпътстваща диагноза в някои от случаите се споменава аутизъм, West синдром (OMIM#308350), симптоматична (криптогенна) епилепсия, PWS/AS и Pitt-Hopkins синдром (OMIM#610954). Заболяването при всички представени случаи има прогресиращ характер. Началото на заболяването варира между първите месеци след раждане и 3 годишна възраст. При всички изследвани случаи липсват говорни умения и се наблюдава загуба на социален контакт. Друга характерна особеност при всички засегнати деца от тази група е наличието на стереотипни движения на ръцете, симптом на „миещи ръце” и краката. Моторното развитие при тези деца е също тежко засегнато. Наблюдава се мускулна хипотония,

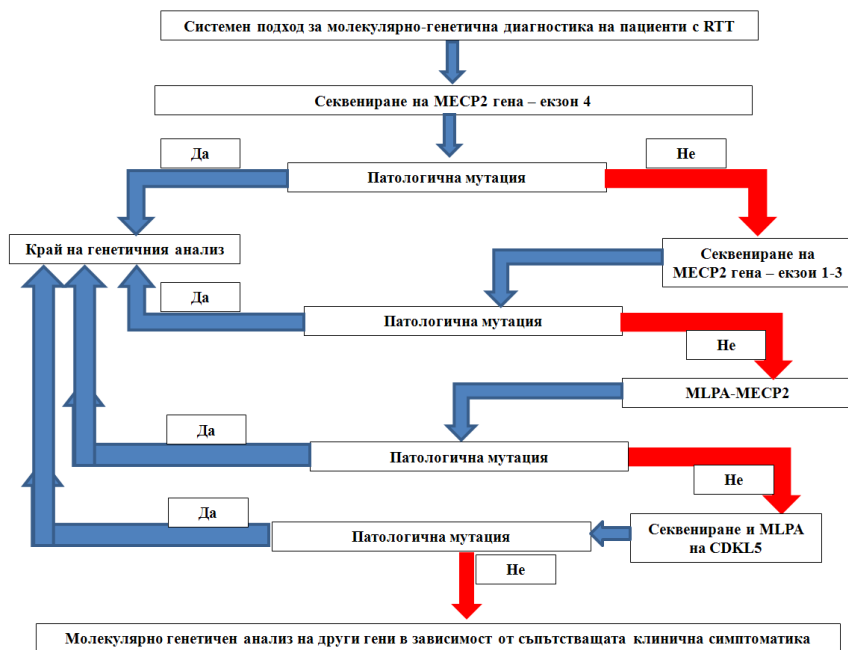
забавен растеж на главата, клатещо се нестабилно тяло или ходене на пръсти, сколиоза. В някои случаи самостоятелното придвижване е невъзможно. Гърчове и епилептични припадъци са регистрирани при 15 пациента. Лицев дисморфизъм (микроцефалия) се наблюдава при около 1/4 от изследваните момичета. Всички деца от изследваната група не контролират тазови резервоари.

Появяват се дихателни проблеми, които се задълбочават при стрес, дишането обикновено е нормално в спящо състояние и се появяват проблеми в будно състояние. Губят се нормалните способности за сън. Наблюдават се проблеми в циркулацията, които водят до студени, посиняли крака и ръце. В допълнение се забелязват гастроинтестинални проблеми, включващи тежък гастроезофагеален рефлукс. Налице е обилно слюнкоотделяне.

Десет от изследваните момичета с умствено изоставане (26%) са родени след патологична бременност и операция чрез Цезарово сечение. Редица ваксинации или прекарани тежки инфекциозни заболявания се съобщават от родителите като отключващ фактор за поява на първите патологични симптоми.

## 2.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

Разработеният от нас системен подход за молекулярно-генетични изследвания на Rett синдром е представен на Фигура 9.



Фигура 9. Системен подход за молекулярно-генетичен анализ на пациенти с RTT.

## **1. Секвениране на МЕСР2 гена**

Изследванията започват с PCR/секвениране на екзон 4 на МЕСР2 гена, където попадат 75% от точковите мутации, малки делеции и комбинираната инсерция/делеция при изследваните пациенти (виж по-надолу Таблица 15). Следва секвениране на останалите екзони от МЕСР2, където до момента беше намерена една инсерция на 4 бд в екзон 3 при български пациент.

След пълното прочитане на кодиращата последователност, екзон/интронните граници и промоторната област на МЕСР2 гена, се преминава към MLPA анализ за търсене на големи делеции и дупликации по дължината на МЕСР2 гена. С помощта на този анализ бяха открити две големи делеции на екзон 3 и част от екзон 4 на МЕСР2 гена.

## **2. MLPA анализ за търсене на големи делеции и дупликации**

Секвенционният анализ на МЕСР2 гена има едно сериозно ограничение - изпуска големи дефекти (делеции и дупликации), обхващащи повече от един екзон. Големите делеции и дупликации на X хромозомата до скоро оставаха неидентифицирани при жени, поради липсата на надежден диагностичен метод разпознаващ нормална от увредена X хромозома.

Този проблем беше преодолян с въвеждането на MLPA анализ [[www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)]. Първото приложение на тази техника за диагностични цели в България беше направено в хода на разработването на този дисертационен труд, първо за диагностика на X хромозомни делеции при мускулна дистрофия тип Дюшен/Бекер [Todorova, Todorov et al., 2008]. В последствие тази разработка беше използвана за въвеждане на други MLPA китове, базиращи се на тест на брой копия за диагностика на други X – свързани заболявания, като разглежданите тук умствени заболявания.

В настоящия дисертационен труд ние използвахме MLPA кит, анализиращ едновременно X хромозомните гени МЕСР2, CDKL5 и ARX, големи делеции или дупликации в които биха могли да са асоциирани с умствено изоставане при момичета. При изследване на момичета за гени от X хромозомата интерпретацията на резултатите е комплицирана, поради наличието на две копия от X хромозомни гени. Делеция при пациент от женски пол се детектира като наполовина намален/и пик(ове), спрямо този/тези при контролата. Наличието на дупликация се детектира като по-висок пик(ове) от този/тези при контролата.

Прецизната интерпретация на резултатите изисква извършването на математически калкулации за количествена оценка на получените генни фрагменти. За

нашите цели най-подходящ се оказва следният математически алгоритъм: всеки фрагмент отчетен като променен (по-нисък или по-висок) спрямо контролата се калкулира самостоятелно и независимо от останалите; пресмята се средно аритметично от площите на двата съседни пика (преди и след анализирания от нас пик); площта на анализирания пик се разделя на средно-аритметичната стойност от двата съседни пика; получената стойност се разделя на аналогичната стойност при контролата; полученото съотношение се интерпретира както следва:

съотношение около 1 – нормален резултат

съотношение <0.6 – делеция

съотношение >1.6 – дупликация

### 3. Други изследвани гени

В допълнение, в зависимост от клиничната симптоматика при част от засегнатите момичета беше секвениран генът CDKL5, където се съобщават около 5-10% от мутациите асоциирани с Rett синдром. Съпътстваща диагноза PWS/AS също беше проверена със съответните молекулярно-генетични тестове (виж по-надолу текста).

### 2.3. РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА МОМИЧЕТА С RETT СИНДРОМ

В хода на проведените молекулярно-биологични изследвания бяха открити точкови мутации при 7 пациента (7/38=18.4%). Точковите мутации засягат 5 различни нуклеотидни/аминокиселинни позиции. Резултатите са представени в Таблица 2 (номера 1-5). Откритите нуклеотидни замени са от 5 типа и всички те попадат в екзон 4 на MECP2 гена: с.473C→T, p.Thr158Met; с.763C→T, p.Arg255X (открита при две момичета); с.808C→T, p.Arg270X (открита при две момичета); с.880C→T, p.Arg294X и с.916C→T, p.Arg306Cys. Всички точкови мутации в изследваната група представляват транзиции на С към Т. Всички тези транзиции засягат CpG динуклеотид, където 5-метилцитозин лесно се деаминира и преминава в тимин, пропуска се от поправящите системи и остава фиксиран в генома като патологична мутация (model of mutagenesis by methylation-mediated deamination in CpGs) [Kunkel and Alexander, 1986]. В два от случаите се заменя една аминокиселина с друга. Missense мутацията p.Thr158Met засяга неконсервативен остатък в домена на белтъка, отговорен за свързване с метилиран регион (Methylation Binding Domain, MBD). Оказва се, че мутантният протеин свързва само два пъти по-слабо метилирана ДНК в сравнение с дивия тип.

Компютърното моделиране с цел анализ на влиянието на мутацията p.Thr158Met върху структурата на MBD показва почти идентични резултати между дивия и мутантния тип, което означава че MBD запазва нормалните си свойства и функционална специфичност [Ghosh et al., 2008]. Тези резултати съвпадат и с данните от кръговия дихроизъм, които показват, че вторичната структура на мутантния p.Thr158Met тип е сходна с тази на дивия тип, както в отсъствие, така и в присъствие на ДНК [Ghosh et al., 2008]. От друга страна обаче, температурната стабилност на MBD при мутантния протеин е съществено намалена в сравнение с дивия тип [Ghosh et al., 2008], което най-вероятно обяснява патологичната роля на този протеин.

Въпреки че, механизмът на повлияване структурата и/или функцията на протеина при мутацията p.Thr158Met е доста неясен, се установява, че това е една от най-честите мутации в MECP2 гена [Ballestar et al., 2000]. Авторите предполагат, че този аминокиселинен остатък може да играе друга важна роля в белтъчната функция, като например може да участва във взаимодействия с домена, отговорен за подтискане на транскрипцията (transcriptional-repression domain).

Втората missense мутация p.Arg306Cys се намира в домена, отговорен за подтискане на транскрипцията (transcriptional-repression domain), но за момента няма доказан ефект върху белтъчната функция, въпреки че патогенната ѝ роля е безпорна, тъй като е отново една от често срещаните мутации при RTT пациенти.

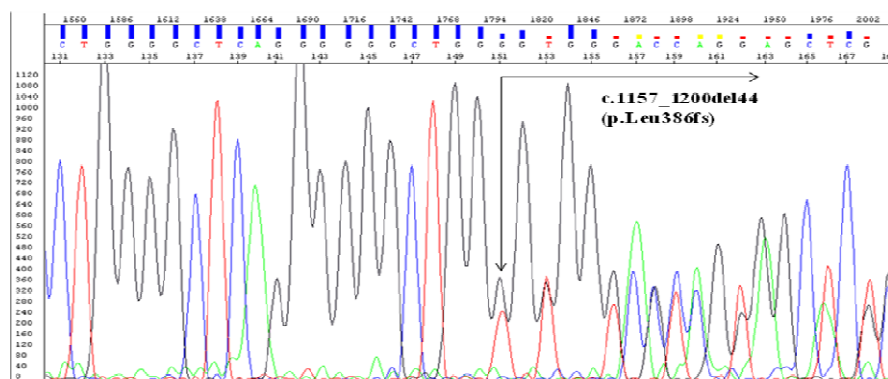
**Таблица 2. Мутации в MECP2 гена при пациенти с диагноза Rett синдром.**

№	Екзон	Нуклеотидна замяна	Аминокиселинна замяна
1	4	c.473C→T	p.Thr158Met
2	4	c.763C→T*	p.Arg255X
3	4	c.808C→T*	p.Arg270X
4	4	c.880C→T	p.Arg294X
5	4	c.916C→T	p.Arg306Cys
6	4	c.1157_1200 del44	p.Leu386fs
7	3 и част от екзон 4	c.27-?_*?del*	Делция на част от белтъка
8**	4	c.[584_624del41insTT; 638delTinsCA]	Indel (frameshift)
9**	3	c.321insGAAG	p.(Lys107fs)

\* Тези мутации са открити при двама пациенти  
Мутациите са съобщени в мутационната база данни за MECP2 гена, с изключение на №8 и 9, отбелязана със \*\*, които са непубликувани до момента [www.mecp2.chw.edu.au].  
Мутациите са открити със секвенционен анализ, с изключение на №7, открита чрез MLPA.

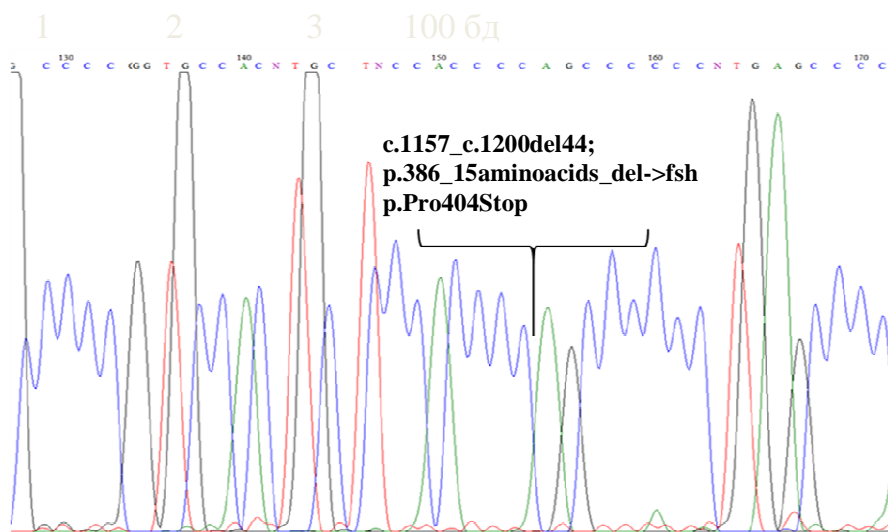
Останалите три точкови мутации генерират стоп кодон (nonsense) и по този начин причиняват преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза и тежка клинична изява на заболяването.

В допълнение секвенционният анализ на екзон 4 от МЕСР2 гена доведе и до откриването на една делеция на 44 бд - с.1157\_1200del44, р.Leu386fs (Фигура 10).



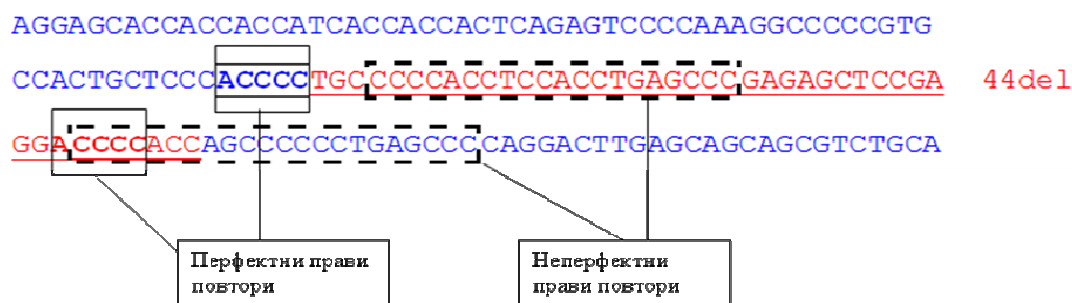
**Фигура 10. Секвенционен анализ, показващ мутацията c.1157\_c.1200del44; p.386\_15aminoacids\_del->fsh p.Pro404Stop**

За потвърждаване на тази делеция и прецизно определяне на точната 5' и 3' точка на разкъсване (breakpoint) беше използван нов амплификационен продукт, в средата на който попада предполагаемия делетиран регион. Амплификационният продукт беше разделен на 3% агарозен гел и визуализираният по-лек патологичен фрагмент беше екстрахиран от гела, ре-амплифициран и секвениран (Фигура 11). По този начин беше доказана делецията на 44 базови двойки в екзон 4 на МЕСР2 гена.



**Фигура 11. Секвенционен анализ, показващ мутацията c.1157\_c.1200del44; p.386\_15aminoacids\_del->fsh p.Pro404Stop**

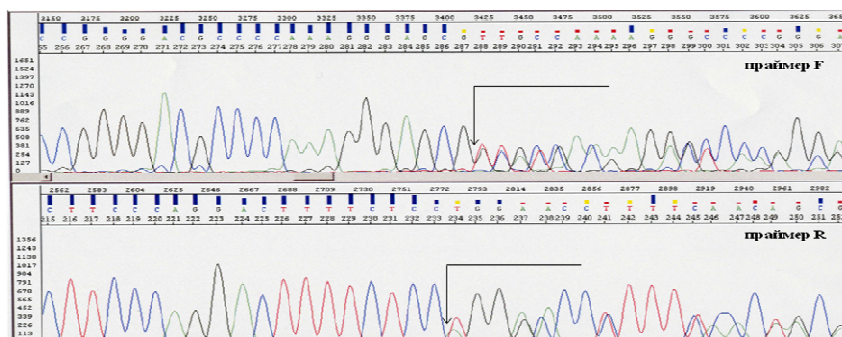
Тази делеция причинява разместване на рамката на четене на генетичната информация и по този начин води до преждевременно прекратяване на белтъчната синтеза. Свързана е с тежка клинична изява на заболяването при нашия пациент. Интересно е да се отбележи, че тази делеция попада в един от делеционните „горещи региони” за МЕСР2 гена, като в този регион са докладвани делеции на 41, 44, 46 и 70 нуклеотида, както и комплексни мутационни събития като indels [De Vona et al., 2000; Lee et al., 2001]. По отношение на клиничната изява на тези мутации е важно да се отбележи, че „preserved speech variants” с подобна на RTT клиника също се дължат на делеции на 41 и 44 нуклеотида точно в този регион, което ги определя като алелни форми на класическия RTT [De Vona et al., 2000]. Фактът че в горещия делеционен регион се случват de novo еднотипни мутационни събития, предполага участие на околната секвенция (микросреда) в провокирането на молекулните дефекти. Задълбоченият анализ на околната секвенция, фланкираща делециите в този регион, показва наличието на директни (прави) повтори, които биха могли да провокират приплъзване на полимеразата в хода на репликацията [De Vona et al., 2000]. Микросредата, в която се случва откритата в настоящето проучване делеция на 44 бази е представена на Фигура 12. Наличието на перфектни и неперфектни директни (прави) повтори в двата фланга на делецията предполагат репликационни приплъзвания на полимеразата, последвани от неточни срязвания и/или снаждания като най-вероятен механизъм за възникване на мутацията.



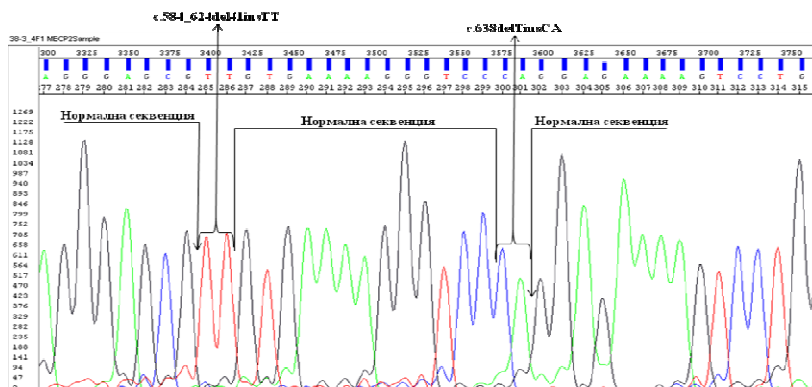
**Фигура 12.** Анализ на секвенцията в непосредствена близост до 44бд делеция в МЕСР2 гена. Делетираните бази са представени в червено. Анализираният прави повтори са оградени.

В допълнение при едно дете с диагноза RTT от румънски произход беше открито комплексно мутационно събитие – комбинация от две инсерции/делеции (indels) – с.[584\_624del41insTT; 638delTinsCA] (Фигура 13). За потвърждаване на тази мутация и прецизно идентифициране на типа ѝ беше използван аналогичен на описания при горната делеция на 44 базови двойки подход: нов амплификационен продукт беше разделен на 3% агарозен гел и визуализираният по-лек патологичен фрагмент беше

екстрахиран от гела, ре-амплифициран и секвениран (Фигура 14). По този начин беше доказана комплексна мутация – две независими делеционно/инсерционни мутационни събития (indels) в MECР2 гена (непубликувана до момента).

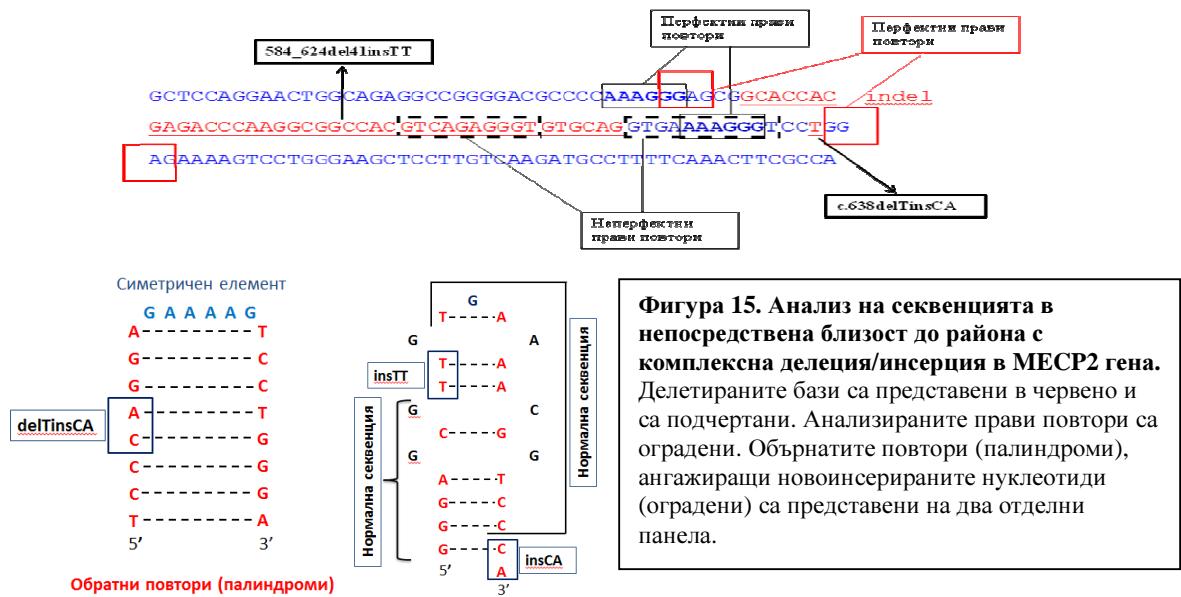


**Фигура 13. Секвенционен анализ, показващ мутацията с.[584\_624del41insTT; 638delTinsCA]**



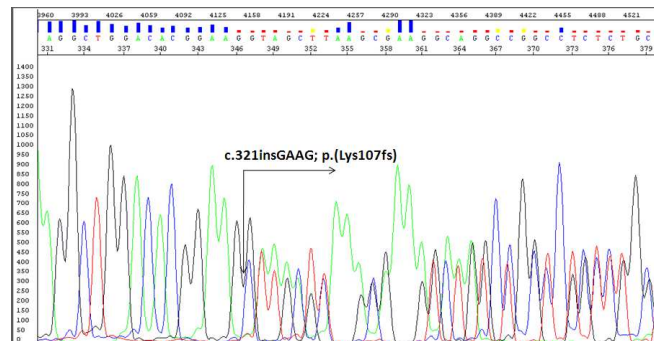
**Фигура 14. Секвенционен анализ след екстракция на по-лекия фрагмент от агарозен гел, rePCR и секвениране. Визуализира се комплексен мутационен профил върху един алел: с.[584\_624del41insTT; 638delTinsCA]**

Двете мутационни събития в комплексния indel засягат един алел и най-вероятно са причинени от серия репликационни приплъзвания в права и обратна посока с участието на директни (прави) повтори [Chen et al., 2005]. Такива комплексни генни пренареждания, включващи множество делеционни и инсерционни събития са едни от най-сложните молекулни нарушения, които трудно могат да се обяснят с известните механизми на мутагенеза. Опит за изясняване механизма на възникване на открития в настоящето проучване комплексен indel е представен на Фигура 15. Задълбоченият анализ на околната секвенция показва наличието на перфектни и неперфектни директни (прави) повтори и перфектни и неперфектни палиндроми, заграждащи симетрични елементи, с чието участие се описва генерирането на комплексните мутационни преобразувания.



**Фигура 15. Анализ на секвенцията в непосредствена близост до района с комплексна делеция/инсерция в MECR2 гена.** Делетираните бази са представени в червено и са подчертани. Анализираните прави повтори са оградени. Обърнатите повтори (палиндроми), ангажиращи новоинсерираните нуклеотиди (оградени) са представени на два отделни панела.

Всички представени до тук мутации попадат в екзон 4 на MECR2 гена. Само при един пациент от изследваната група беше открита мутация в екзон 3 на MECR2 гена. Тази мутация представлява непубликувана до момента инсерция на 4 бд с.321insGAAG, p.(Lys107fs) (Фигура 16). Клиничната диагноза при този пациент първоначално е била PWS, поради затлъстяване (с ясно изразена фамилна predisпозиция).



**Фигура 16. Секвенционен анализ, показващ мутацията c.321insGAAG; p.(Lys107fs)**

Инсерираните 4 нуклеотида представляват интерес от генетична гледна точка, тъй като генерират симетричен елемент GAAGGAAG, чрез повторение на мотива GAAG (Фигура 17). При задълбоченият анализ на околната секвенция беше установено изобилие на (G)GA(AG) перфектни и полу-перфектни директни повтори, които биха могли да участват в неправилното сдвояване на веригите и приплъзване на полимеразата, завършващо с инсериране на GAAG мотив [Chen et al., 2005].

```

AGCCCACCACTCTGCTGAGCCCCGAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAG
AAGGGTCAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCAAA
CAGCGGGCTCCATCATCCGTGACCGGGACCCATGTATGATGACCCAC
CCTGCCTGAAGGCTGGACACGGAAGCTTAAGCAAAAGAAATCTGGCCGCT
CTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTGATCAA

```

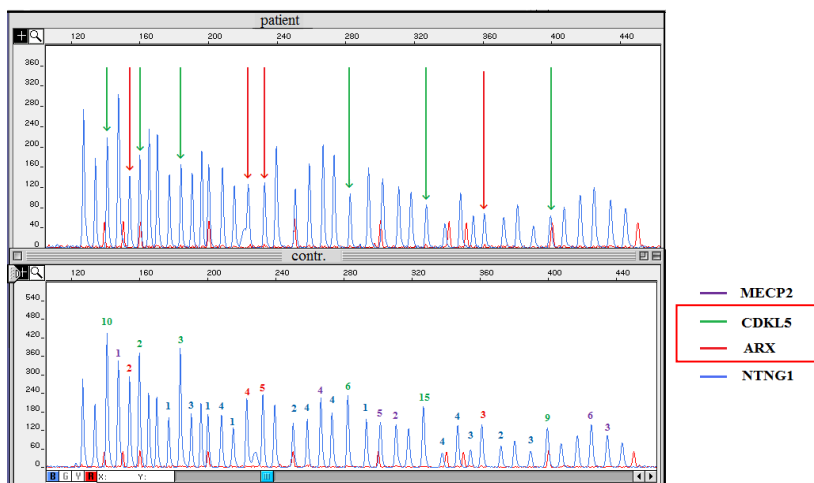
Перфектни и полуперфектни  
прави повтори

c.321insGAAG

**Фигура 17. Секвенция около мястото на инсерция на 4 бд в екзон 3.** Инсерираните нуклеотиди са заградени, както и перфектни и полуперфектни прави повтори (G)GA(AG) в региона.

Всички описани до тук мутации в MECP2 гена са свързани с тежка клинична симптоматика, бърза прогресия на заболяването и тежко засягане както на умственото така и на физическото развитие на засегнатите деца.

Пациентите, при които не бяха открити мутации в MECP2 гена чрез секвенционен анализ бяха подложени на MLPA анализ. Това изследване доведе до откриването на 3 големи делеции. Едната делеция покрива гените CDKL5 и ARX, разположени на късото рамо на X хромозомата (Фигура 18).



**Фигура 18. MLPA електрофоретичният профил при пациент с делеция на гените CDKL5 (зелени стрелки) и ARX (червени стрелки)**

Резултатите от математическата обработка на делетираните фрагменти от CDKL5 и ARX гените при пациентката са представени в Таблица 3.

Получените съотношения за всички пикове, съответстващи на екзони на гените CDKL5 и ARX при пациента спрямо контролата показват стойности 0.6 и по-малки от 0.6, което съответства на делеция.

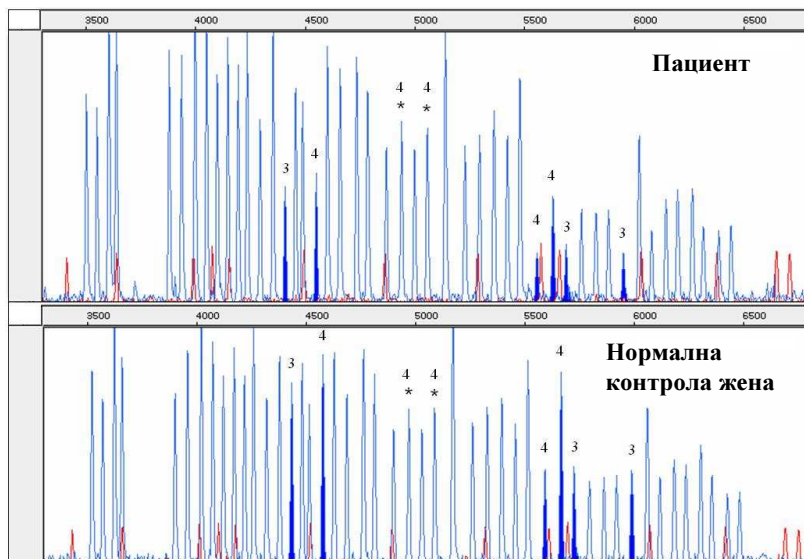
**Таблица 3. Математическа обработка на данните от MLPA анализа**

ген	екзон	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
CDKL5	10	0.86	1.83	0.47
	2	0.9	1.51	0.60
	3	1.12	1.88	0.60
	6	0.58	1.14	0.51
	15	0.93	1.58	0.59
	9	0.9	1.86	0.48
ARX	2	0.56	1.13	0.50
	4	0.86	1.45	0.59
	5	0.75	1.28	0.59
	3	1.08	1.85	0.58

Този резултат от молекулярно-генетичния анализ напълно потвърждава резултата от цитогенетичния анализ, показващ Хр делеция при тази пациентка. Детето е насочено за молекулярно-генетични изследвания на 2 годишна възраст като първоначалната диагноза е атипичен Rett синдром, но в последствие диагнозата беше променена на аутизъм.

Наличието само на едно копие от гените CDKL5 и ARX при пациентката с атипичен Rett провокира нашия интерес да секвенираме тези гени с цел търсене на мутации, които биха могли да са причина за наблюдаваната клинична симптоматика. Секвенционният анализ на тези гени не доведе до откриване на патологични изменения. В допълнение при тази пациентка бяха проведени и изследвания на гена FMR1, тъй като имаше съобщения за носителство на пълна CGG експанзия при пациентка с Хр делеция и клинична диагноза аутизъм [Vazna et al., 2008]. Резултатите при нашата пациентка показаха нормален генотип за FMR1 гена.

Други големи делеции бяха открити при двама пациента като делецията е една и съща и покрива целия екзон 3 и част от екзон 4 на MECP2 гена (Фигура 19).



**Фигура 19.** MLPA електрофоретичният профил при пациент с делеция на екзон 3 и част от екзон 4. Делетираните екзони са маркирани в синьо, цифрата над пика показва номера на екзона, в който попада дадената сонда. Двата пика за екзон 4 маркирани със \* не са делетирани; това са двата крайни фрагмента от екзон 4 и 3' нетранслируемия регион.

Резултатите от математическата обработка на делетираните фрагменти са представени в Таблица 4. Получените съотношения за всички делетирани пикове показват стойности <0.6.

**Таблица 4. Математическа обработка на данните от MLPA анализа**

Екзон на МЕСР2 гена	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
3	0.50	0.93	0.54
3	0.28	0.69	0.41
3	0.31	0.83	0.37
4	0.53	1.11	0.48
4	0.26	0.67	0.39
4	0.73	1.27	0.57
4*	1.12	1.08	1.04
4*	0.76	0.81	0.94

Интересно е да се спомене, че докато точковите мутации в екзон 4 на МЕСР2 гена водят до тежка клинична симптоматика с епилептични прояви, то делецията на екзон 3 и част от екзон 4 не е свързана с епилепсия и EEG профилът е нормален, но все пак трябва да се има предвид, че това са най-малките деца в групата и не се знае в бъдеще как ще прогресира клиничната симптоматика при тези пациенти.

## **Проверка наличието на откритите генни изменения при родителите на болните деца**

Всички открити мутации в изследваната група пациенти бяха проверени при техните родители. Резултатите показаха, че всички мутации са нововъзникнали при болното дете и не са унаследени от родителите. Тези резултати потвърждават патологичния характер на откритите генни изменения.

## **Сравняване на получените данни със световната база данни**

Откритите мутации в настоящето изследване са известни в световната литература, с изключение на комплексното мутационно събитие с.[584\_624del41insTT; 638delTinsCA], доказано при румънски пациент и новооткритата инсерция на 4 бд с.321insGAAG, p.(Lys107fs) при български пациент. Повечето открити мутации при нашите пациенти в действителност са едни от най-честите генетични изменения в MECP2 гена, причиняващи класическа форма на Rett синдром. В световната литература се съобщава, че откритите мутации в 94% от пациентите с Rett синдром са точкови мутации, малки екзонни делеции и инсерции и само в около 6% се откриват големи и комплексни генни преобразувания [Philippe et al., 2006]. По отношение на типа мутации открити в нашата група пациенти, нашите резултати се различават от публикуваните, като при нас се установяват 75% точкови мутации, малки делеции и инсерции и 25% големи делеции и комплексни мутационни събития.

От молекулна гледна точка MECP2 гена се характеризира с две особености: 1) мутациите в този ген са de novo, причинени от независими мутационни събития, но са едни и същи делеции, nonsense и missense, засягащи едни и същи нуклеотиди или региони, което показва наличието на мутационни „горещи точки” [Wan et al., 1999] и прякото участие на околната секвенция в мутационните събития; 2) честа находка в този ген са комплексни мутационни събития върху един алел, които биха могли да се обяснят с геномната архитектура на региона, в който попада MECP2 гена. Този хромозомен сегмент е богат на директни (прави) и обратни повтори в малък брой копия, чието присъствие може да генерира нестабилни ДНК структури, които биха могли да индуцират едноверижни нарушения и прекръстосвания в ДНК, колапс на репликационната вилка и приплъзване на полимеразата [Carvalho et al., 2009].

В настоящето изследване бяха открити мутации при 31.6% от пациентите с диагноза Rett синдром. Този резултат надвишава значително публикуваните данни, където генетично се изясняват едва 10-15% от случаите [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>].

Това показва, че нашите пациенти са много добре клинично изяснени и правилно подбрани.

С настоящето изследване бяха поставени първите молекулярно-генетични диагнози на различни форми X-свързано умствено изоставане, като бяха разработени за диагностично приложение, за първи път в България, както методи за търсене на големи делеции и дупликации, така и методи за търсене на точкови мутации.

Съществено беше увеличен процентът на генетично изяснените форми X-свързано умствено изоставане ( $12/38=31.6\%$ ), което има отношение към планиране на здраво поколение в засегнатите семейства.

#### **2.4. ДОПЪЛНИТЕЛНИ ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С НЕИЗЯСНЕНИ МУТАЦИИ**

Пациентите с неясни молекулярни дефекти бяха секвенирани за мутации в CDKL5 гена, като такива не бяха намерени. Случаите, при които се обсъждаше като възможна диагноза PWS/AS не бяха потвърдени с проведените молекулярно-генетични изследвания за PWS/AS (виж по-надолу текста).

Проведените молекулярно-генетични изследвания показаха, че точкови мутации, делеции и инсерции в екзони 3 и 4 на MECP2 гена, както и големи делеции в MECP2 гена са причина за наблюдаваните отклонения в нервно психическото развитие при нашите пациенти с диагноза RTT. Нашите проучвания доведоха до откриване на мутации, в групата пациенти с клинична диагноза класически Rett синдром с изключение на два случая, където като алтернативни диагнози се обсъждаха PWS и съответно AS и Pitt-Hopkins синдром.

### **3. PWS/AS**

#### **3.1. КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С ДИАГНОЗА PWS/AS СИНДРОМ**

При пациентите с диагноза PWS/AS като съпътстваща диагноза при някои пациенти от мъжки пол беше обсъждан и синдром на чуплива X хромозома. При един пациент поради тежката мускулна хипотония беше обсъждана като възможна диагноза спинална мускулна атрофия (SMA, OMIM#253300). Умственото изоставане в тази група пациенти е значително по-леко в сравнение с представените до сега групи, като преобладава лека и гранична степен на изоставане в умственото развитие ( $IQ=50-80$ ). Наблюдават се основно забавяне в говорните умения и комуникативни проблеми. Моторно-двигателните функции при тези пациенти, обаче са съществено нарушени.

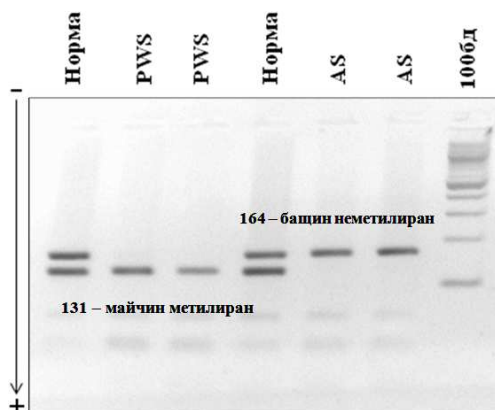
При пациентите с диагноза PWS не са характерни епилептични пристъпи, с едно изключение. При този пациент се съобщават гърчови пристъпи, провокирани според родителите от ваксинация. Почти при всички деца от тази група се наблюдава изразена подкожна мастна тъкан, мастна гърбица, мастна престилка, затлъстяване.

При пациентите с AS EEG данните показват средностепенни неспецифични изменения. И при трите описани от нас случая родителите съобщават гърчове по време на прекарани тежки инфекциозни заболявания.

Дисморфични лицеви характеристики се наблюдават при всички пациенти от тази група, като особено характерни са лицевите изменения при пациентите с AS – лица на “happy puppet”.

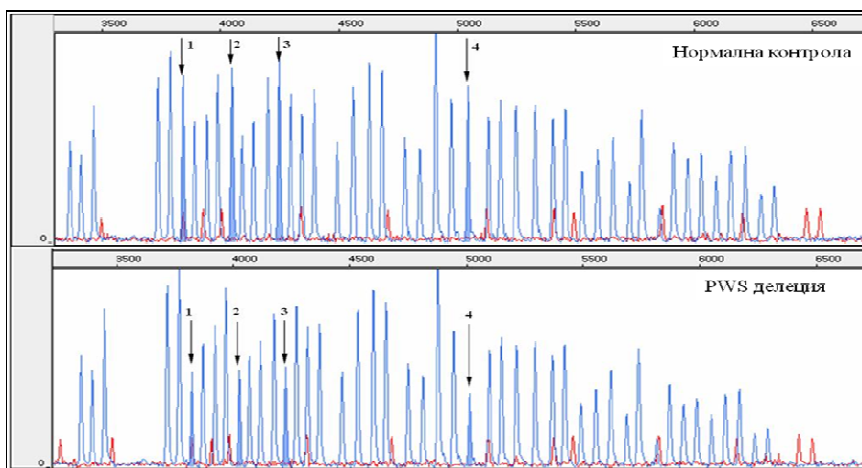
### 3.2. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

В настоящето проучване беше въведен за първи път в България, метод за специфичен по отношение на метилирането PCR, в резултат на който е възможно разграничаване на бащино неметилирано (функционално активно) копие от майчино метилирано (функционално неактивно) копие. За целта е необходимо ДНК да се третира предварително с натриев бисулфит за конвертиране на неметилирания цитозин до урацил, докато 5-метил цитозин остава непроменен. В резултат на този специфичен тест на анализ и последваща амплификация при нормални индивиди се получават два амплификационни продукта: 164 бд – бащин неметилиран фрагмент и 131 бд – майчин метилиран фрагмент (Фигура 20). Липсата на по-тежкия фрагмент при наличие на майчин метилиран определя диагноза PWS, докато липса на по-лекия фрагмент при наличие на бащин неметилиран отговаря на диагноза AS. По този начин във всяка реакция винаги е налице вътрешна контрола, което прави теста изключително надежден за диагностични цели.

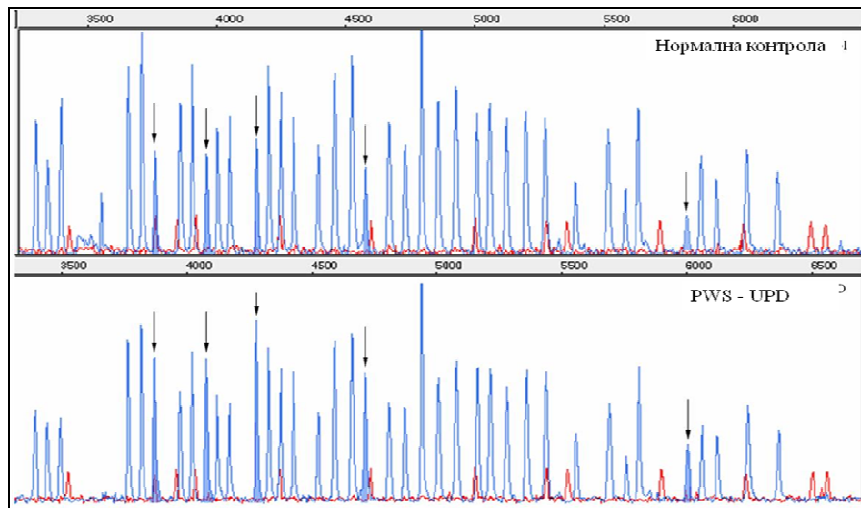


Фигура 20. Электрофоретичен профил на амплификационните продукти на майчин метилиран и бащин неметилиран фрагмент в района на 15q11-q12.

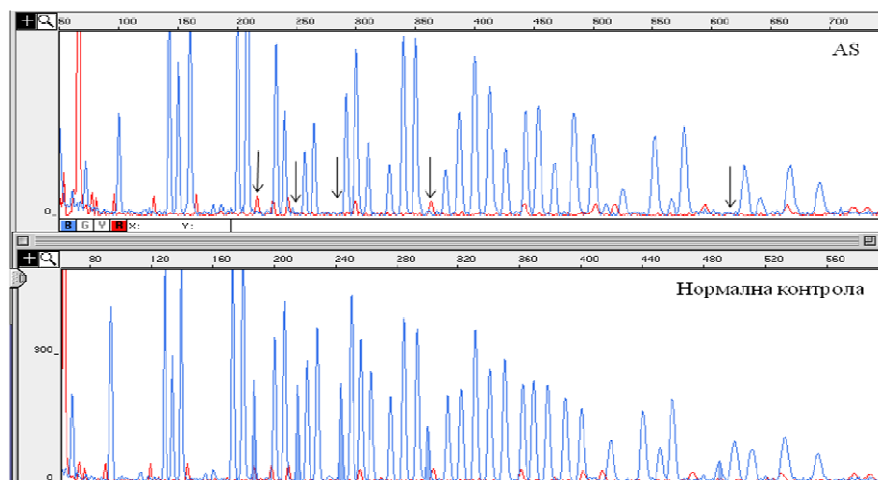
В случай че, изследваните пациенти с предполагаема клинична диагноза PWS/AS покажат наличието на два нормални фрагмента с теста за метилиране, то диагноза PWS/AS, дължаща се на дефект в 15q региона се изключва. Ако се потвърди един от двата патологични варианта – липса на майчин метилиран или бащин неметилиран фрагмент, се преминава към MLPA анализ в изпълнение на CNT – тест на брой копия и MT – тест за метилиране. Целта е да се изясни точно типът патологичен дефект – делеция (чрез тест на брой копия) или унипарентна дизомия - UPD (чрез теста за метилиране). Определянето на точния тип дефект има значение за прогнозиране до известна степен хода на заболяването. При пациентите с делеция, независимо дали диагнозата е PWS или AS, тестът за брой копия показва наполовина намален сигнал (Фигура 21), докато тестът за метилиране показва профил идентичен с този при нормална контрола (резултат не е показан). Нормалният профил се дължи на наличието на едно метилирано и едно неметилирано копие, в резултат на което неметилираното копие се срязва от HhaI рестриктазата и остава наполовина намален сигнал, съответстващ само на метилираното копие. При PWS унипарентна дизомия, наличните две майчини метилирани копия се отразяват на теста за метилиране като двойно увеличен фрагмент спрямо контролата (несрязан наполовина от HhaI рестриктазата, Фигура 22). При AS теста за метилиране показва липсващи фрагменти за метилиране (посочени със стрелки на Фигура 23), поради наличието само на бащино(и) неметилирано(и) копие, които се срязват от HhaI рестриктазата.



**Фигура 21. MLPA електрофоретичен профил - тест за брой копия.**



Фигура 22. MLPA електрофоретичен профил - тест за метилиране при PWS.



Фигура 23. MLPA електрофоретичен профил - тест за метилиране при AS.

#### А. РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНАТА ГРУПА ПАЦИЕНТИ С ДИАГНОЗА PWS/AS СИНДРОМ

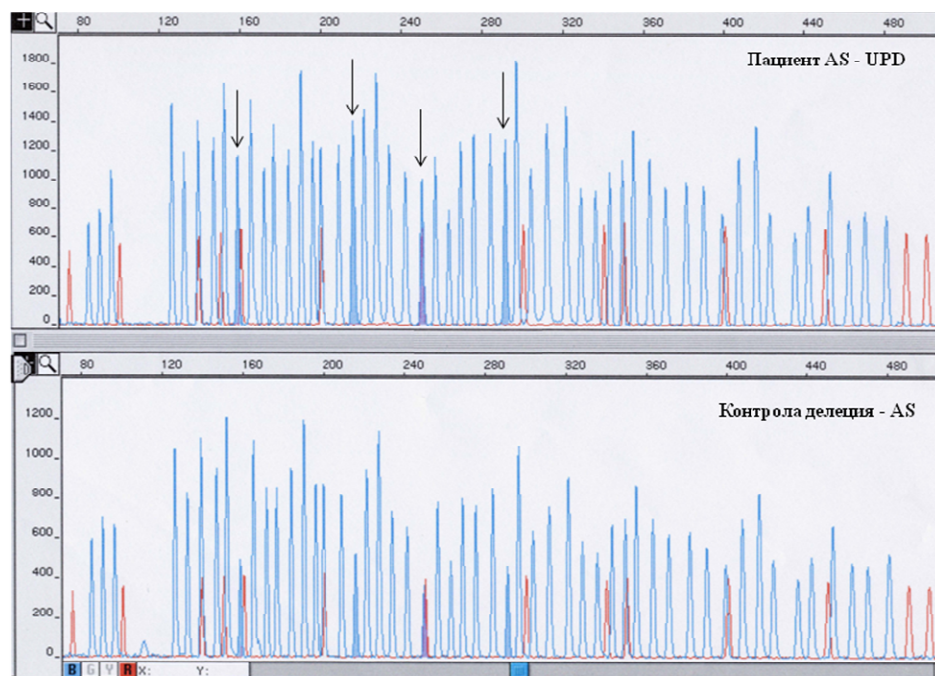
Получените резултати от PCR теста, специфичен по отношение на метилирането са представени на Фигура 20. От изследваните 16 пациента с диагноза PWS/AS, 9 бяха верифицирани на молекулно ниво – 7 PWS и 2 AS. Получените резултати показаха 56.25 % генетично верифицирани диагнози, което е доста висок процент, на фона на наблюдаваната комплексна клинична симптоматика.

Проведеният в последствие MLPA анализ при пациентите с установена диагноза PWS/AS показва, че 5 от пациентите с PWS се дължат на делеции в 15q региона и 2 от случаите са причинени от унипарентна дизомия (Фигура 21 и Фигура 22). Резултатите от математическата обработка на делетираните фрагменти са представени в Таблица 5. Получените съотношения за всички делетирани пикове показват стойности <0.6.

**Таблица 5. Математическа обработка на данните от MLPA анализа**

PWS/AS регион	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковете
SNRPN (СрG остров)	0.53	1.06	0.50
SNRPN екзон 1	0.60	1.21	0.50
SNRPN (СрG остров)	0.63	1.18	0.53
SNRPN екзон 3	0.55	1.23	0.45

При доказаните пациенти с диагноза AS два от случаите са резултат от делеции в 15q региона (Фигура 24), делетираните фрагменти са намалени на половина. Клиниката при един от пациентите с AS е резултат от UPD (Фигура 24), удвоените пикове са двойно по-високи, отколкото при делетираната контрола.



**Фигура 24. MLPA електрофоретичен профил - тест за брой копия при AS.**

Математическата обработка на резултатите при AS с делеция и UPD са представени в Таблица 6.

Диагнозата при UPD се поставя на базата на липсващ майчин метилиран фрагмент в хода на PCR анализа и наличието на две копия от бащин неметилиран фрагмент, детектирани чрез теста за брой копия.

**Таблица 6. Математическа обработка на данните от MLPA анализа.**

<b>PWS/AS регион</b>	<b>Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент</b>	<b>Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола (пациент с UPD, неразличим от контролата)*</b>	<b>Съотношение на площите на пиковите</b>
UBE3A (15q12)	0.40	0.70	0.57
NDN (15q11.2)	0.57	1.04	0.55
SNRPN (15q12)	0.46	0.88	0.52
SNRPN (15q12)	0.46	0.82	0.56

\* Пиковите при пациент с UPD са двойно по-високи (две копия) от тези при пациент с делеция и са неразличими от пиковите при нормална контрола.

### **Проверка наличието на откритите генни изменения при родителите на болните деца**

При нашите пациенти с генетично верифицирана диагноза PWS/AS не се налагат допълнителни генетични изследвания при техните родители, тъй като нито един от доказаните молекулни дефекти не може да е унаследен от незасегнатите родители. Тези мутации са нововъзникнали в засегнатите деца.

### **Сравняване на получените български данни със световната база данни**

Получените резултати при нашата извадка пациенти с диагноза PWS/AS, макар и малка, слабо се различават от публикуваните честоти на делециите спрямо случаите, дължащи се на унипарентна дизомия: 67% делеции спрямо 33% унипарентна дизомия (Таблица 7) [<http://www.genetics.ie>].

**Таблица 7. Честота на генетичния дефект при PWS (по литературни данни)**

<b>Генетичен дефект</b>	<b>Процентно съотношение</b>
De novo делеция на 15q11-q13 върху бащината хромозома	75 - 80%
Майчина (UPD) на хромозома 15	20 - 25%

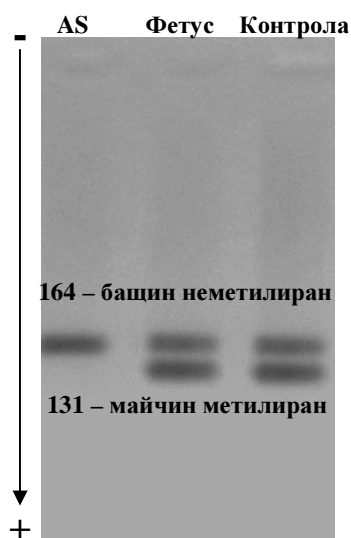
[National Center for Medical Genetics, Ireland - <http://www.genetics.ie>]

Важно е да се отбележи високият процент на молекулно верифицирани диагнози при изследваната група пациенти 56.25%, което показва добра клинична подготовка и прецизно клинично представяне на пациентите преди да се предприеме молекулярно-генетично изследване.

### Пренатална диагностика при семейство с диагноза AS при предишно дете

Въпреки че молекулните дефекти, които се откриват при пациенти с диагноза AS не са унаследени от родителите, се смята че когато се касае за грешки в метилирането и променена експресия на импринтвани гени е възможно тези грешки да са провокирани от генетичните характеристики на двамата родители. Публикувани са редица семейства с PWS, при които бащата е мозайка в спермалните клетки по отношение на делецията, открита в болното дете [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed]. По тази причина, на семейства, които вече имат болно дете с такава диагноза се препоръчва специализирано ехографско изследване с цел оценка на мускулния тонус на плода (при пациенти с PWS/AS се наблюдава вътреутробно забавяне на движенията на плода, поради мускулна хипотония) и пренатална диагностика.

За периода на настоящия дисертационен труд беше направена една пренатална диагностика на семейство, при което предишното дете е с генетично верифицирана диагноза AS. Пренаталната диагностика беше извършена върху хорионни въси (~10 mg), получени чрез хорионна биопсия в 12+5 гестационна седмица. Изолираната ДНК от хорионните въси беше подложена на бисулфитно конвертиране и последваща амплификация за оценка наличието на бащин неметилиран и майчин метилиран фрагмент в рисковия регион на хромозома 15q – SNRPN гена. Заедно с фетуса беше изследвано повторно болното дете и нормална контрола. Получените резултати са представени на Фигура 25. При фетуса се установява наличието на бащин неметилиран и майчин метилиран фрагмент, което съвпада с генетичния профил при нормалната контрола и се различава от наблюдавания профил при болното дете с диагноза AS, където липсва майчин метилиран фрагмент. Заключение е незасегнат фетус по отношение на диагноза AS.



Фигура 25. Пренатална диагностика при семейство с AS.

## **В. ДОПЪЛНИТЕЛНИ ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С НЕИЗЯСНЕНИ МУТАЦИИ**

Пациентите от мъжки пол с неясни молекулни дефекти (5 пациента) бяха изследвани допълнително за мутации в FMR1 гена, тъй като при тях като диференциална диагноза се обсъждаше и синдром на чуплива X хромозома. В допълнение при 3 от момчетата беше изследван и ARX гена. Един пациент беше секвениран за мутации в MECР2 гена и беше изследван чрез MLPA анализ за микроделеционни синдроми, поради неясна клинична диагноза. Нито едно от проведените допълнителни изследвания не доведе до откриване на молекулярно-генетичен дефект и диагнозата при тези пациенти остава неизяснена.

Един от пациентите с предварителна клинична диагноза AS остана с неизяснен молекулен дефект. При този пациент са необходими допълнителни изследвания например в гените UBE3A и MECР2, които за момента са невъзможни поради липса на генетичен материал от този пациент

## **4. MDS**

### **4.1. КЛИНИЧНИ СИМПТОМИ**

Терминът микроделеционни синдроми (Microdeletion syndromes, MDS) обединява група заболявания с изоставане в развитието от неясен произход и/или умствено изоставане, дължащи се на делеции или дупликации на региони от различни човешки хромозоми. В тази група попадат 4 пациента от настоящето изследване. Предварителната клинична диагноза при две от децата е била Williams-Beuren syndrome (WBS), едно с диагноза Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) и едно с диагноза DiGeorge syndrome. Основната клинична характеристика е умствено изоставане от по-слабо изразено до по-тежка симптоматика. Кардиологични проблеми се наблюдават при 4<sup>-те</sup> деца. Дисморфичният фациес е силно изразен.

### **4.2. МОЛЕКУЛЯРНО ГЕНЕТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

За откриване на големи делеции и дупликации, покриващи цели региони от човешките хромозоми ние избрахме MLPA анализ. Този метод има редица предимства – отличава се с висока степен на надежност в диагностиката на трудни за откриване делеции и дупликации, евтин е и е лесно изпълним (в рамките на два дни се получава резултат), използва се малко количество ДНК и е приложим за пренатална диагностика.

В използвания от нас кит са включени следните синдроми:

- 1p36 микроделеционен синдром
- 2p16 микроделеционен синдром
- 3p29 микроделеционен синдром
- 9q22.3 микроделеционен синдром
- 15q24 микроделеционен синдром
- 17q21 микроделеционен синдром
- 22q13 Phelan-Mcdermid
- Cri du Chat синдром, 5p15
- DiGeorge синдром, 22q11
- DiGeorge регион 2, 10p15
- Langer-Giedion синдром, 8q
- Miller-Dieker синдром, 17p
- NF1 микроделеционен синдром
- Prader-Willi/Angelman
- MECP2/Xq28 дупликация
- Rubinstein-Taybi синдром
- Smith-Magenis синдром
- Sotos синдром, 5q35.3
- Wagr синдром
- Williams синдром
- Wolf-Hirschhorn, 4p16.3

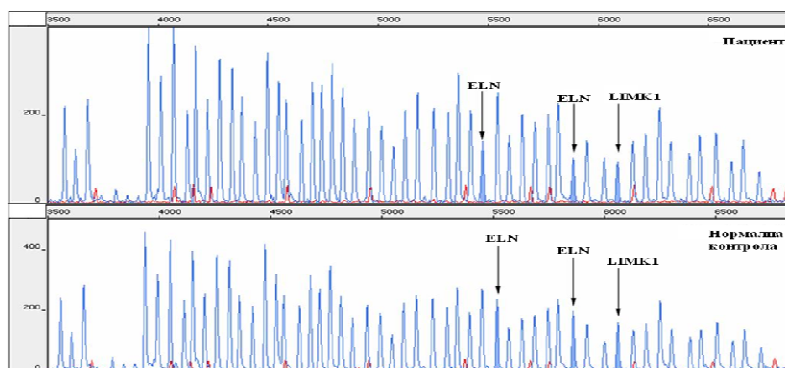
Интерпретацията на резултатите става след математическа обработка, при което се получава математически израз на делетиран или дуплициран генен фрагмент.

Важно условие за успешното изпълнение и интерпретиране на резултатите от MLPA анализа е качеството на геномната ДНК от пациента и контролите. За целта всички ДНК проби бяха подложени на ре-фенолизиране с цел пречистване преди изпълнението на анализа.

Друга важна особеност на този анализ е необходимостта от едновременно изследване на поне 3 нормални контроли успоредно с анализираната проба. Спрямо тези контролни проби се извършва интерпретацията и математическата обработка на резултатите.

## РЕЗУЛТАТИ ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ С ПРЕДПОЛАГАЕМА ДИАГНОЗА МИКРОДЕЛЕЦИОННИ СИНДРОМИ

Използваният набор от сонди, включен в MLPA кита доведе до доказване на диагнозата WBS и при двете изследвани деца (Фигура 26).



Фигура 26. MLPA електрофоретичен профил при пациент с WBS спрямо нормална контрола.

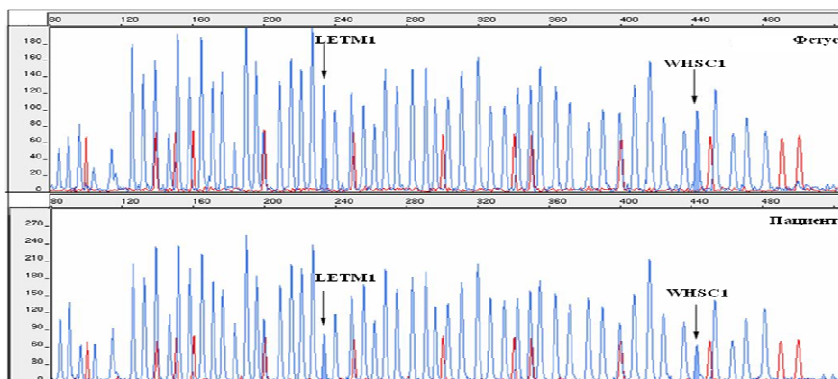
И в двата случая специфичните генетични локуси ELN и LIMK1, разположени в региона 7q11.23, показаха наполовина намален сигнал, съответстващ на делеция в хетерозиготно състояние. Резултатите от математическата обработка са представени в Таблица 8.

**Таблица 8. Математическа обработка на данните от MLPA анализа**

Регион	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
ELN – 7q11.23	0.62	1.30	0.48
ELN – 7q11.23	0.55	0.95	0.58
LIMK1 – 7q11.23	0.85	1.43	0.59

Пациентът с предполагаема клинична диагноза WHS също беше верифициран на молекулно ниво.

В конкретното семейството беше извършена и пренатална диагностика. ДНК от плода беше изолирана от амниотична течност, взета чрез амниоцентеза в 17 гестационна седмица. Получените резултати от MLPA анализа при болното дете и при фетуса са показани на Фигура 27.



**Фигура 27. MLPA електрофоретичен профил при пациент с WHS спрямо нормална контрола.**

При пациента се установи делеция на специфичните генетични локуси LETM1 и WHSC1, разположени в региона 4p16.3, докато фетусът не носи тази делеция. Математическата обработка на резултатите е представена в Таблица 9 (А и Б) На базата на тези изследвания е родено здраво дете във фамилия със засегнат индивид с WHS.

## Таблица 9. Математическа обработка на данните от MLPA анализа

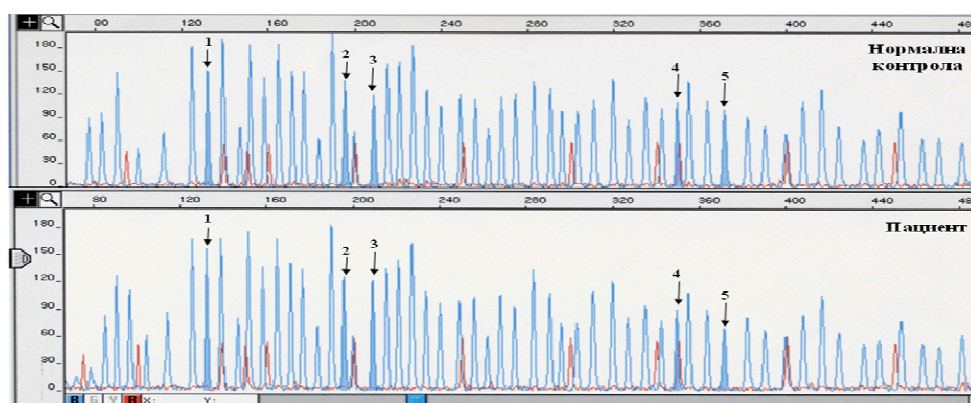
### А – При пациента

Регион	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при пациент	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
LETM1 – 4p16.3	0.81	1.95	0.42
WHSC1 – 4p16.3	0.56	1.15	0.49

### Б – При фетуса

Регион	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при фетуса	Площ на пика/ средно аритметична площ на двата съседни пика при контрола	Съотношение на площите на пиковите
LETM1 – 4p16.3	2.40	1.95	1.23
WHSC1 – 4p16.3	1	1.15	0.87

Пациентът с предполагаема клинична диагноза DGS не беше потвърден с молекулярно генетичния тест (Фигура 28). Наличните 5 сонди, локализирани в двата рискови DGS региона - 22q11 (3 сонди – 2, 3 и 5 от Фигура 28) и 10p15 (2 сонди – 1 и 4 от Фигура 28) показаха нормален профил в сравнение със тези при здрава контрола.



Фигура 28. MLPA електрофоретичен профил при пациент с DGS спрямо нормална контрола.

Клиничната диагноза при този пациент подлежи на ревизиране.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличните до момента данни върху български пациенти с умствено изоставане бяха много оскъдни, като едно от добрите проучвания в тази област е от 1994 г, базирано на цитогенетичен анализ [Доц. Л. Ангелова, МБАЛ „Св. Марина” гр. Варна, 1994, дисертационен труд]. Молекулярно-генетични изследвания при пациенти с умствено изоставане не бяха налични у нас до преди четири години, когато започна разработването на настоящия дисертационен труд.

Проведените молекулярно-генетични тестове при изследваната група пациенти с умствено изоставане доведоха до изясняване на молекулния дефект при 28 от 90 пациента (31%).

В изследваната група момчета с диагноза FXS бяха открити 4 генетични дефекта в FMR1 гена: две пълни мутации и два случая - мозайки пълна мутация/нормален алел и пълна мутация/премутация/нормален алел. Процентът на генетично верифицирани случаи в тази група е 12,5%. Разработените протоколи в настоящия дисертационен труд са подходящи за скринингови цели при жени с цел изясняване на носителския им статус и оценка на риска да имат болно дете с FXS. Останалите 28 пациента от тази група с неизвестен молекулен дефект бяха подложени на допълнителни молекулярни изследвания, базирайки се на наблюдаваната клинична симптоматика при всеки един от тях, но мутации не бяха открити. Въпреки проведенният широк спектър молекулярно-генетични изследвания в групата момчета с умствено изоставане и предполагаема клинична диагноза FXS, голям процент от тях останаха с неизвестен генетичен дефект. Причина за това, от една страна, е смесеният характер на изследваната група, в която попадат и пациенти с чисто аутистично поведение и дискретни синдромни изменения, при които целта на теста е по-скоро изключване на диагноза FXS. От друга страна, става ясно че умственото изоставане при момчета е полигенно детерминирано, като мутации в X-свързани и автосомни гени са отговорни за сходна клинична симптоматика.

Проведените молекулярно-генетични изследвания при групата момичета с диагноза RTT синдром доведоха до откриване на 12 мутации в MECP2 гена (12/38 =31.6%). Откритите мутации са 5 типа. Освен точкови мутации в нашата група открихме и една вътреекзонна делеция, едно комплексно мутационно събитие indel, една инсерция на 4 бд и две еднакви големи делеции, покриващи един екзон и част от следващия. Откритото комплексно мутационно събитие представлява двоен indel и е непубликувана мутация до момента, описана е за първи път в настоящето проучване.

Непубликувана е и инсерцията на 4 бд, която попада в екзон 3 на MECР2 гена. Беше проведен задълбочен анализ на околната секвенция по отношение на повторените мотиви в близост до намерените мутационни събития с оглед изясняване на механизмите на мутагенеза. По отношение на типа мутации открити в нашата група пациенти, нашите резултати се различават от публикуваните, като при нас се установяват 75% точкови мутации, малки делеции и инсерции и 25% големи делеции и комплексни мутационни събития.

От молекулярна гледна точка MECР2 гена се характеризира с две особености: 1) мутациите в този ген са *de novo*, причинени от независими мутационни събития, но са едни и същи, което показва наличието на мутационни „горещи точки” и предполага прякото участие на околната секвенция в мутационните събития; 2) честа находка в този ген са комплексни мутационни събития върху един алел, които биха могли да се обяснят с геномната архитектура на региона, в който попада MECР2 гена.

В допълнение при някои пациенти с подходяща клиника беше изследван и CDKL5 генът, но мутации не бяха открити.

Молекулярно-генетичните изследвания при пациентите с диагноза PWS/AS доказаха диагнозата при 7 PWS пациента (54%) и при 2 AS пациента (67%). Откритите патологични изменения в 15q11-q13 региона бяха разпределени както следва: 5 делеции PWS, 2 унипарентна дизомия PWS, 1 делеция AS и 1 унипарентна дизомия AS.

Проведеният MLPA анализ при пациенти с клинична диагноза, отговаряща на WBS (двама пациента), WHS (един пациент) и DGS (един пациент) доведе до изясняване на молекулярния дефект и на тази база верифициране на клиничната диагноза при първите три случая (75%). Диагноза DGS не беше потвърдена на молекулярно ниво. Трябва да се отбележи, че високият процент доказани микроделеционни синдроми може да се дължи на изключително малката група изследвани пациенти.

В заключение на проведените молекулярно-генетични изследвания може да се каже, че процентът генетично верифицирани диагнози в групата на пациентите с RTT синдром (31.6%), PWS/AS (56.25%) и MDS (75%) е сравнително висок. Публикуваните данни за генетично верифицирани пациенти с X-свързано умствено изоставане са около 15% [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]. Високият процент у нас говори за много добро клинично разпознаване и охарактеризиране на тези заболявания, благодарение на което става възможно прецизирано назначаване на генетичните тестове.

От друга страна, процентът на генетично доказани FXS случаи (12,5%) е доста нисък. По литературни данни FXS е втората по честота причина за умствено изоставане след синдром на Даун (OMIM # 190685) [Rousseau et al., 1995]. Възможно е причина за

този нисък процент да е подборът на момчетата в изследваната група, където са включени и някои чисто аутистични случаи без допълнителни синдромни изменения.

Нашата група пациенти с все още неизвестен молекулен дефект представлява обект за нови проучвания за търсене на нови гени и локуси, мутации в които водят до умствено изоставане. Тези пре-скринирани пациенти, при които са изключени най-честите възможни генетични причини, са подходящи и за научни проучвания с микрочипов анализ. Имайки предвид високата себестойност на тестовете от нова генерация, анализиращи целия геном, от изключителна важност е пациентите да бъдат предварително скринирани за най-честите известни генетични причини и да се изключат тези, които се дължат на дефекти във вече известни гени.

## ИЗВОДИ

1. Разработените методики за молекулярно-генетична диагностика на FXS позволяват разграничаване на нормални от премутантни и експандирали до пълна мутация алели; дават възможност за оценка на метилиране и позволяват детекция на мозайки; могат да се прилагат за скринингови цели.
2. В изследваната група момчета с диагноза FXS, нисък процент (12.5%) бяха охарактеризирани на молекулно ниво, което се различава от публикуваните данни. Вероятна причина е смесеният характер на изследваната група, както и възможното наличие на мутации в други гени, отговорни за сходна клинична симптоматика.
3. Разработеният системен подход за анализ на пациенти с RTT позволи охарактеризирането на около 1/3 от случаите, което е по-висок процент в сравнение с публикуваните данни.
4. Мутациите, открити в нашата група пациенти с RTT се различават от публикуваните данни по високия процент (25%) големи делеции и комплексни мутационни събития и 75% точкови мутации, малки делеции и инсерции. Две от откритите мутации са докладвани за първи път от нашия екип.
5. От молекулна гледна точка MECP2 генът се характеризира с *de novo* мутации, причинени от независими мутационни събития, попадащи в „горещи точки” и комплексни мутационни събития върху един алел, което предполага прякото участие на околната секвенция и геномната архитектура на региона в мутагенезата.
6. Разработените методики за молекулярно-генетична диагностика на PWS/AS позволяват оценка на метилиране и промяна в брой копия, което дава възможност за охарактеризиране на делеции и унипарентна дизомия, основните дефекти причиняващи тези синдроми.
7. Разработените методики за молекулярно-генетична диагностика на микроделеционни синдроми дават възможност за прецизно охарактеризиране на диагнозата и пренатална диагностика в засегнатите семейства.
8. В изследваната група пациенти с умствено изоставане 31% бяха охарактеризирани на молекулно ниво, като този процент надвишава съществено публикуваните данни.

## БИБЛИОГРАФИЯ

### БЪЛГАРСКА ЛИТЕРАТУРА:

1. Ангелова Л. (1994), дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”.

### ЧУЖДОЕЗИЧНА ЛИТЕРАТУРА:

1. Ballestar et al., 2000 *Biochemistry* 39(24):7100-6.
2. Carvalho et al., 2009 *Hum Mol Genet* 18(12):2188-203.
3. Chen et al., 2005 *Hum Mut* 26(2):125-134.
4. De Bona et al., 2000 *Eur J Hum Genet* 8(5):325-30.
5. Ewart et al., 1993 *Nature Genet* 5:11-16.
6. Gandelman et al., 1992 *Am J Hum Genet* 51: 571-578.
7. Ghosh et al., 2008 *J Biol Chem* 283(29):20523-20534.
8. Grasso et al., 1999 *Am J Med Genet* 85: 311–16.
9. Hagberg et al., 1997 *Eur Child Adolesc Psych* 1:5-7.
10. Henke et al., 1997 *Nucleic Acids Res* 25(19):3957-3958.
11. Kleefstra et al., 2002 *Clin Genet* 61:359-362.
12. Kunkel and Alexander, 1986 *J Biol Chem* 261(1):160-6.
13. Lee et al., 2001 *Brain and Development* 23:S138-S143.
14. Lehrke, 1972 *Am J Ment Defic* 76:611-619.
15. Lehrke, 1974 *Birth Defects Orig Artic Ser* 10:1-100.
16. Leonard and Wen, 2002 *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8:117-134.
17. Mandel and Chelly, 2004 *Eur J Hum Genet* 12:689-693.
18. Mila et al., 1996 *J Med Genet* 33: 338–40.
19. Nolin et al., 1994 *Am J Med Genet* 51: 509–12.
20. Penrose, 1938 HMSO, London, Vol.229
21. Philippe et al., 2006 *Eur J Med Genet* 49(1):9-18.
22. Polder et al., 1998 *Ned Tijdschr Geneesk*, 142:1607-1611.
23. Priest et al., 1961 *Am J Ment Defic*, 66:42-50.
24. Ropers, 2006 *Current Opinion in Genetics & Development* 16:260-269.
25. Rousseau et al., 1995 *Am J Hum Genet* 57:1006-1018.
26. Schmucker & Seidel, 1999 *Am J Med Genet* 84:221–5.
27. Stromme et al., 2002 *Nature Genet* 30:441-445.
28. Tabolacci et al., 2007 *Eur J Hum Genet* 16: 209–14.
29. Tassabehji et al., 1996 *Nat Genet* 13(3):272-3.
30. Tassone et al., 2008 *J Mol Diagn* 10:43-49.
31. Todorov et al., 2009 *BMJ Case Reports* [doi:10.1136/bcr.06.2008.0139].
32. Todorov et al., 2010a *Genet Counseling* 21(2): 257-262.
33. Todorov et al., 2010b *Balkan J Med Genet* 13(2): 11-25.
34. Todorov et al., 2010c *Mol Biotechnol* 45:150-154.
35. Todorova, Todorov et al., 2008 *Neuromusc Disorders* 18(8):667-670.
36. Turner et al., 1996 *Am J Med Genet* 64:196-197.
37. Vazna et al., 2008 *Eur J Hum Genet* 16 (suppl 2) P01.089, ESHG Conference, May 31 - June 3, 2008, Barcelona, Spain.
38. Wan et al., 1999 *Am J Hum Genet* 65:1520-1529.
39. Wright et al., 1959 *Am J Dis Child* 97:445-456.
40. Wright et al., 1997 *Hum Molec Genet* 6: 317-324.
41. [www.genetics.ie](http://www.genetics.ie)
42. [www.mecp2.chw.edu.au](http://www.mecp2.chw.edu.au)
43. [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com)
44. [www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM)
45. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

**ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С  
ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

● Публикации във връзка с дисертационния труд

1. Todorova A, *Todorov T*, Georgieva B, Lukova M, Guerguelcheva V, Kremensky I, Mitev V. (2008) MLPA analysis/complete sequencing of the DMD gene in a group of Bulgarian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. **Neuromusc Disorders** 18(8):667-670 (**Impact Factor 2.977**).
2. *Todorov T*, Todorova A, Kirov A, Dimitrov B, Carvalho R, Nygren AOH, Boneva I, Mitev V. (2009) Fragile X mosaic male full mutation/normal allele detected by PCR/MS-MLPA. **BMJ Case Reports** (doi:10.1136/bcr.06.2008.0139)
3. *Todorov T*, Todorova A, Georgieva B, Mitev V. (2010) A unified rapid PCR method for detection of normal and expanded trinucleotide alleles of CAG repeats in Huntington chorea and CGG repeats in Fragile X syndrome. **Molecular Biotechnology** 45:150-154 (**Impact Factor 2.091**).
4. *Todorov T*, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R, Mitev V. (2010) Molecular Basis of mental retardation in a sample from Bulgaria. **Genet Counseling** 21(2):257-262 (**Impact Factor 0.543**).
5. *Todorov T*, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R and Mitev V(2010) Clinical/molecular data of mental retardation in Bulgaria. **Balkan Journal of Medical Genetics** 13(2): 11-25.

**ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 5.611**

● **Научни прояви във връзка с дисертационния труд**

- 1). **Todorov T**, Todorova A, Kirov A, Carvalho R, Boneva I, Mitev V (2008). Fragile X mosaic male detected by PCR/MS-MLPA, Eur J Hum Genet, 2008, 16 (suppl 2) P01.090, ESHG Conference, May 31 - June 3, 2008, Barcelona, Spain.
- 2). Todorova A, **Todorov T**, Tincheva R, Avdjieva D, Boneva I, Mitev V (2008). Rett syndrome in two years old girl with Xp deletion – case report, Eur J Hum Genet, 2008, 16 (suppl 2) P01.108, ESHG Conference, May 31 - June 3, 2008, Barcelona, Spain.
- 3). Kirov A, **Todorov T**, Todorova A, Mitev V. (2009), MLPA analysis for microdeletion syndromes diagnosed in Bulgaria. Williams-Beuren syndrome – case report, Paediatrica Croatica, 2009, 53 (suppl 2) MBB-70, 67
- 4). **Todorov T**, Todorova A, Tincheva R, Avdjieva D, Mitev V. (2009). Molecular diagnostics of mental retardations in Bulgarian patients, Paediatrica Croatica, 2009, 53 (suppl 2) MBB-58, 78
- 5). Todorova A, **Todorov T**, Tincheva R, Avdjieva D, Mitev V. (2009). Molecular diagnostics for Prader-Willi/Angelman syndrome (PWS/AS) in Bulgarian patients, Paediatrica Croatica, 2009, 53 (suppl 2) MBB-69, 78
- 6). **Todorov T**, Todorova A, Tincheva R, Avdjieva D, Mitev V. (2009). MECP2 mutations in Bulgarian Rett syndrome patients, Eur J Hum Genet, 2009, 17 (suppl 2) 97, P02.190, ESHG Conference, May 23 - 26, 2009, Vienna, Austria.
- 7). Kirov A, **Todorov T**, Todorova A, Kalenderova S, Mitev V. (2009). Williams-Beuren syndrome in a Bulgarian patients diagnosed by MLPA kit for microdeletion syndromes, Eur J Hum Genet, 2009, 17 (suppl 2) 346, P12.165, ESHG Conference, May 23 - 26, 2009, Vienna, Austria.
- 8). **Todorov T**, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Tincheva R, Mitev V. (2010). Molecular genetic testing of mental retardation in Bulgaria, Eur J Hum Genet, 2010, 18 (suppl 1) 328, P12.128, ESHG Conference, June 12 - 15, 2010, Gothenburg, Sweden.
- 9). **T. Todorov**, A. Todorova, C. Motoescu, V. Bojinova, D. Iancu, D. Craiu, D. Stoian, L. Barbarii, P. Dimova, V. Mitev. (2011). Novel, recurrent mutations and a complex rearrangement in the MECP2 gene, Eur J Hum Genet, 2011, pp.420, P12.138, ESHG Conference, May 28 - 31, 2011, Amsterdam, The Netherlands.
- 10). **Todorov T**, Todorova A, Motoescu C, Bojinova V, Iancu D, Craiu D, Stoian D, Barbarii L, Dimova P, Mitev V. (2011) MECP2 gene mutations in Bulgarian and Romanian Rett syndrome patients. Balkan Journal of Medical Genetics 14 (suppl):74; P61; 9<sup>th</sup> Balkan Meeting of Human Genetics, 15-17 September, Timisoara, Romania. **POSTER AWARD**

## ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

1. Todorova A, **Todorov T**, Georgieva B, Lukova M, Guergueltcheva V, Kremensky I, Mitev V. (2008) MLPA analysis/complete sequencing of the DMD gene in a group of Bulgarian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. **Neuromusc Disorders** 18(8):667-670. (ЦИТИРАНИЯ 4)
  - Proceeding of the 10<sup>th</sup> Asian and Oceanian Congress of Child Neurology – АОССН, 2009, pp. 37-42
  - Pediatrics, 2009, 123(3):e471-475
  - Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2009, 13(3):427-431
  - Journal of Neurology, 2011, 258(9):1610-1623
  
2. **Todorov T**, Todorova A, Georgieva B, Mitev V. (2010) A unified rapid PCR method for detection of normal and expanded trinucleotide alleles of CAG repeats in Huntington chorea and CGG repeats in Fragile X syndrome. **Molecular Biotechnology** 45:150-154. (ЦИТИРАНИЯ 1)
  - Current Opinion in Psychiatry, 2011, 24(5):419-424
  
3. **Todorov T**, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R, Mitev V. (2010) Molecular Basis of mental retardation in a sample from Bulgaria. **Genet Counseling** 21(2):257-262. (ЦИТИРАНИЯ 1)
  - Current Opinion in Psychiatry, 2011, 24(5):419-424
  
4. **Todorov T**, Todorova A, Avdjieva D, Dimova P, Angelova L, Tincheva R and Mitev V (2010) Clinical/molecular data of mental retardation in Bulgaria. **Balkan Journal of Medical Genetics** 13(2): 11-25. (ЦИТИРАНИЯ 1)
  - Current Opinion in Psychiatry, 2011, 24(5):419-424

## ПРИНОСИ

1. С настоящето проучване беше поставено началото на молекулярно-генетичната диагностика на синдроми с умствено изоставане в България.
2. Бяха оптимизирани методи за молекулярно-генетичен анализ на синдроми с умствено изоставане, като бяха разработени и публикувани в международни списания собствени методики.
3. Беше открито уникално комплексно мутационно събитие – двоен indel и непубликувана до момента инсерция на 4 бд в МЕСР2 гена.
4. Пациентите с все още неизяснен молекулен дефект, представляват добре подбрана и охарактеризирана група за анализи от нова генерация, като микрочипов анализ, секвениране от ново поколение и т.н.

## SUMMARY

Mental retardation is observed in a broad spectrum of syndromes and in nonsyndromic variant and represents clinically and genetically highly heterogeneous group of disorders. Delay in mental development and absent speech may be the only clinical finding, or may be associated with progressive neurodevelopmental deficits, seizures, autism, ataxia. A variety of genes, X-linked or autosomal, have been found to be involved in the pathogenesis of these syndromes. The most common form of X-linked mental retardation is the Fragile X mental retardation syndrome (FXS), which is due to an expansion of an unstable CGG repeat in the 5'UTR of the FMR1 (fragile X mental retardation 1) gene. The polymorphic CGG repeat numbers 6 to 54±2 copies in normal individuals, 55±2 to 200 copies in healthy carriers of premutation, and >200 copies in FXS patients.

One of the most common forms of severe mental retardation in females is Rett syndrome (RTT), which is mostly due to point mutations or large deletions in MECP2 (methyl-CpG binding protein 2) gene, and rarely in CDKL5 (cyclin dependent kinase-like 5) gene.

On the other hand, mental retardation in females in combination with infantile spasms and other early onset seizures could be caused by mutations in CDKL5 gene.

Some forms of mental retardation and epilepsy in males have been associated with a common mutation dup24 or other mutations in Aristaless X (ARX) gene.

An autosomal gene mutation that gives rise to common clinical symptoms include Prader-Willi/Angelman syndromes (PWS/AS), due to a deletion of 15q11-q13 or uniparental disomy (UPD) 15. Imprinted genes (expressed only from maternal or paternal genome) are localized in the PWS/AS critical region of chromosome 15 and the gene regulation there is based on the specific methylation of the non-active copy. The CpG islands around the exon 1 of SNRPN gene are methylated on the maternal chromosome (non-active) and completely devoid of methylation on the paternal chromosome (active). This finding is used in developing diagnostic methods for PWS/AS. In case of male patients PWS can have some clinical aspects of FXS, and in female patients – some clinical aspects of RTT.

Moreover, a number of deletions along different chromosomes and genes are associated with mental retardation and cause the so called microdeletion syndromes (MDS).

In the present study, molecular genetic testing was performed in 90 mental retardation patients who were clinically classed as FXS (n=32), RTT (n=38), PWS/AS (n=16) and MDS (n=4; 2 Williams Beuren syndrome (WBS), 1 DiGeorge syndrome (DGS) and 1 Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS)).

The present study was focused on clarification of molecular defects along the FMR1, MECP2, CDKL5 and ARX genes. In addition, methylation analysis of exon 1 of the SNRPN gene was performed and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis for large deletions/duplications, and for methylation status of FMR1 and SNRPN genes.

In the FXS group only 4 mutations in the FMR1 gene (12,5%) were found. In RTT group 12 mutations along the MECP2 gene (31.6%) were determined, but no CDKL5 gene mutations were found. In the PWS/AS group 9 pathological changes were detected along the 15q11-q13 region (56.25%). The MLPA analysis in the group of the MDS revealed 3 genetically confirmed cases (2 WBS and 1 WHS) out of 4 patients tested (75%). Thus, the molecular defects were clarified in 31% of the patients.

The percentage of genetically proved diagnoses among our RTT patients, PWS/AS and the MDS cases was relatively high, which represents a good clinical recognition of these pathological entities. On the contrary, the percentage of the genetically confirmed FXS cases was relatively low, which was in contrast to the well-known fact that FXS was the second leading cause of mental retardation after the Down syndrome. Most probably this was due to the characteristics of this group being clinically mixed and containing some definite autistic cases.

The main contributions of the present study are the developed and optimized for routine diagnostic use methods for molecular-genetic studies in the group of mental retardation syndromes. A unique complex mutational event – double indel, as well as a novel 4 bp insertion were detected in the MECP2 gene. In total 31% of patients tested were characterized on molecular level.

The present study established the beginning of the molecular-genetic diagnostics of syndromes with mental retardation in Bulgaria.